



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΜΣ ΣΤΗΝ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΘΕΜΑ:

***Μεθοδολογίες για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση
Πολυκυκλικών Αρωματικών Υδρογονανθράκων σε υδατικά
δαίγματα.***

Λαμπρινή Δημητρίου του Χαραλάμπους
Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής
Λάρισα 2021

Η Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή, όπως ορίστηκε στις 27 Φεβρουαρίου του 2020, αποτελείται από τους κ.κ.:

- Α. Τσακάλωφ**, Αν. Καθηγητή Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Επιβλέπων)
- Γ. Ραχιώτης**, Αν. Καθηγητή Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Χ. Χατζηχριστοδούλου**, Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Περίληψη

Η ρύπανση του περιβάλλοντος αποτελεί ένα από τα κυριότερα φαινόμενα που απασχολεί την παγκόσμια κοινότητα, καθώς οι επιπτώσεις της στους ανθρώπους είναι πολλαπλές. Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες αποτελούν μια από τις βασικές χημικές ομάδες ρύπων, καθώς η παρουσία τους στο περιβάλλον είναι συνήθης ενώ η έκθεση σε PAHs έχει συσχετιστεί με ποικίλες επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία. Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η βιβλιογραφική ανασκόπηση μεθοδολογιών για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων σε υδατικά δείγματα.

Αναφορικά με τη μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε, έγινε ανασκόπηση της σύγχρονης επιστημονικής βιβλιογραφίας σε βάσεις δεδομένων όπως το Scopus, PubMed χρησιμοποιώντας σχετικές με το θέμα λέξεις κλειδιά: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), Water, Gas Chromatography (GC), High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Επιπλέον, εκτός από την βιβλιογραφική αναζήτηση πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση προτύπων PAHs με την χρήση GC-MS.

Από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας, προέκυψαν δεδομένα που αφορούσαν την περιγραφή των PAHs σχετικά με την περιβαλλοντική ρύπανση και την επίδρασή τους στην υγεία των ανθρώπων αλλά και σχετικά με τις πιθανές μεθοδολογίες για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των PAHs σε υδατικά δείγματα, με έμφαση στις χρωματογραφικές, δεδομένης της ευρείας εφαρμογής τους.

Η δομή της εργασίας αντιστοιχεί στις εξής ενότητες:

- Δομή και ιδιότητες των PAHs
- Ιστορική αναδρομή των PAHs
- Πηγές προέλευσης των PAHs
- Επίδρασεις των PAHs στην ανθρώπινη υγεία
- Νομοθεσία σχετικά με τους PAHs
- Ενόργανη ανάλυση των PAHs
- Επικύρωση αναλυτικών μεθόδων
- Ταυτοποίηση προτύπων PAHs

Συμπερασματικά, με βάση τα δεδομένα που ανασκοπήθηκαν και την ταυτοποίηση προτύπων PAH που υλοποιήθηκε, οι πλέον κατάλληλες μέθοδοι προσδιορισμού PAHs σε υδατικά διαλύματα θεωρούνται οι GC-MS και HPLC, δεδομένου ότι παρουσιάζουν χαμηλό όριο ανίχνευσης και ως εκ τούτου θεωρούνται υψηλής αξιοπιστίας

Abstract

Environmental pollution is one of the main phenomena of concern to the global community, as its impact on humans is multiple. Polycyclic aromatic hydrocarbons are one of the main chemical groups of pollutants, as their presence in the environment is common and exposure to PAHs has been associated with a variety of effects on human health. The aim of this thesis is to review methodologies for the detection and quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples.

Regarding the methodology used, the current scientific literature was reviewed in databases such as Scopus, PubMed using topic-related keywords: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs,), Water, Gas Chromatography (GC), High Performance Liquid Chromatography (HPLC). In addition, except to the bibliographical search, identification of PAHs standards were done using GC-MS.

The literature review revealed data on the description of PAHs on environmental pollution and their impact on human health and on possible methodologies for the detection and quantification of PAHs in water samples, with emphasis on chromatography, given their wide application.

The structure of the thesis corresponds to the following sections:

- Structure and properties of PAHs
- Historical review of PAHs
- Sources of origin of PAHs
- Effects of PAHs on human health
- Legislation on PAHs
- Instrumental analysis of PAHs
- Validation of analytical methods
- Identification of PAHs standards

In conclusion, on the basis of the data reviewed and the identification of PAH standards implemented, the most appropriate methods for determining PAHs in aqueous solutions are considered GC-MS and HPLC, as they have a low limit of detection and are therefore considered to be of high reliability.

Ευχαριστίες

Η ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας δεν θα ήταν εφικτή χωρίς τη βοήθεια ορισμένων ανθρώπων τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω.

Ευχαριστώ θερμά τον επιβλέποντα Καθηγητή Ανδρέα Τσακάλωφ για την ανάθεση του θέματος, τις συμβουλές, τις διορθώσεις και τη συνεχή επιστημονική καθοδήγηση κατά τη συγγραφή.

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Υγιεινής και Επιδημιολογίας για τη βοήθεια, τη φιλοξενία και το ενδιαφέρον που έδειξαν κατά τη διεξαγωγή της διπλωματικής μου και ιδιαίτερα ευχαριστώ τον κύριο Μιχάλη Κουρέα Μηχανικός Περιβάλλοντος, μεταδιδακτορικός ερευνητής στο εργαστήριο για την πολύτιμη βοήθειά του και τον χρόνο που αφιέρωσε όσον αφορά την χρήση της GC-MS και την καθοδήγηση του καθ' όλη την διάρκεια της εργασίας.

Τέλος, θα ήταν παράληψη να μην ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους ανθρώπους που με στήριζαν καθ' όλη την διάρκεια της.

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη.....	3
Abstract	4
Πίνακας περιεχομένων	6
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	8
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	9
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	10
Εισαγωγή.....	12
Ενότητα 1: Δομή και ιδιότητες των PAHs	13
Ενότητα 2: Ιστορική αναδρομή των PAHs	15
Ενότητα 3: Πηγές προέλευσης των PAHs.....	16
3.1 Φυσικές πηγές των PAHs	16
3.2 Ανθρωπογενείς πηγές των PAHs	17
Ενότητα 4: Επιδράσεις των PAHs στην ανθρώπινη υγεία	18
Ενότητα 5: Νομοθεσία σχετικά με τους PAHs.....	21
Ενότητα 6: Ενόργανη ανάλυση των PAHs.....	22
6.1 Προετοιμασία Πρότυπων Διαλυμάτων.....	23
6.2 Μέθοδοι Εκχύλισης.....	24
6.2.1 Εκχύλιση υγρού – υγρού (Liquid – Liquid Extraction, LLE)	24
6.2.2 Εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid – Phase Extraction, SPE).....	25
6.2.3 Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SOLID-PHASE MICROEXTRACTION-SPME)	26
6.3 ΕΝΟΡΓΑΝΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	27
6.3.1 Μέθοδοι Αέριας Χρωματογραφίας.....	31
6.3.2 Μέθοδοι Υγρής Χρωματογραφίας.....	49
ΕΝΟΤΗΤΑ 7: ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ	54
7.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ.....	55
7.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΠΑΛΗΘΕΥΣΗΣ	55
7.3 ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ / ΕΠΑΛΗΘΕΥΣΗΣ	55
7.3.1 Ειδικότητα / επιλεκτικότητα (specificity / selectivity)	55
7.3.2 Όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD)	56
7.3.3 Επαναληψιμότητα / αναπαραγωγιμότητα (precision).....	56

7.3.4 Γραμμικότητα και εύρος εργασίας (linearity and working range)	56
7.3.5 Ακρίβεια (accuracy, bias)	57
7.3.6 Ανάκτηση (recovery)	57
7.3.7 Αβεβαιότητα μέτρησης (uncertainty)	57
7.3.8 Σταθερότητα (stability)	58
7.4 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ / ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΕΠΑΛΗΘΕΥΣΗΣ ΟΡΓΑΝΩΝ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΥ	58
7.4.1 Αέριος χρωματογράφος	58
ΕΝΟΤΗΤΑ 8: ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ	60
8.1: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	60
8.2: Οργανολογία GC-MS	61
8.3: Επιλογή παραμέτρων GC/ MS	62
8.4: Ταυτοποίηση Πρότυπων Ενώσεων	68
ΕΝΟΤΗΤΑ 9: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	78
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	79

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1:	Η συντακτικοί δομή των 16 PAHs άμεσης προτεραιότητας
Εικόνα 3.1:	Σχηματισμός βενζο[a]πυρενίου από πυρόλυση οργανικής ύλης
Εικόνα 3.2:	Συνήθεις πηγές πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων
Εικόνα 4.1:	Διάγραμμα ροής για τις επιπτώσεις των PAHs στην ανθρώπινη υγεία
Εικόνα 6.1	Στάδια και τρόποι εφαρμογής της εκχύλισης στερεάς φάσης
Εικόνα 6.2:	Απεικόνιση της γενικής λειτουργίας και των σταδίων της SPME.
Εικόνα 6.3	Τυπική διαμόρφωση αέριου χρωματογράφου (φιάλη φέροντος αερίου, ρυθμιστής ροής, σύστημα εισαγωγής δείγματος, στήλη, θερμοστατούμενος κλίβανος, ανιχνευτής, επεξεργαστής δεδομένων)
Εικόνα 6.4	Μέθοδος έγχυσης διαμοιρασμού
Εικόνα 6.5	Μέθοδος έγχυσης μη – διαμοιρασμού
Εικόνα 6.6	Παράγοντες που επηρεάζουν τον διαχωρισμό σε μία στήλη αέριας χρωματογραφίας
Εικόνα 6.7	Ροή υγρού μέσω στενότερης στήλης. Ο ίδιος όγκος υγρού καταλαμβάνει διαφορετικές περιοχές διατομής (A) σε σημεία 1 και 2, όπου το μέγεθος της στήλης είναι διαφορετικό. Αυτό προκαλεί διαφορετικό ρυθμό ροής και επομένως διαφορετική γραμμική ταχύτητα (velocity, v)
Εικόνα 6.8	Ανιχνευτής ιονισμού φλόγας
Εικόνα 6.9	Διάγραμμα GC / MS
Εικόνα 6.10	Οργανολογία υγρής χρωματογραφίας υψηλής – απόδοσης
Εικόνα 8.1:	Οργανολογία GC-MS

Εικόνα 8.2:	Σύστημα A Finnigan Trace GC Ultra/Polaris Quadrupole Ion Trap GC/ MS system.
Εικόνα 8.3:	Αρχική οθόνη του λογισμικού X-Calibur
Εικόνα 8.4:	Απεικόνιση θερμοκρασιακού προγράμματος GC.
Εικόνα 8.5:	Απεικόνιση συνθηκών του εισαγωγέα του δείγματος.
Εικόνα 8.6:	Απεικόνιση συνθηκών του φέρον αερίου.
Εικόνα 8.7:	Απεικόνιση συνθηκών του MS.
Εικόνα 8.8:	Απεικόνιση συνθηκών αρχικής σελίδας δημιουργίας sequence.
Εικόνα 8.9:	Απεικόνιση συνθήκης του Quan Browser.
Εικόνα 8.10:	Χρωματογράφημα πρότυπου δείγματος.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 5.1:	Παραμετρικές τιμές πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAHs) στις διάφορες κατηγορίες
Πίνακας 5.2:	Παραμετρικές τιμές πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAHs) στις διάφορες κατηγορίες τροφίμων βάσει του Καν.1881/2006
Πίνακας 6.1	Αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των PAHs σε διάφορα δείγματα
Πίνακας 6.2	Παραδείγματα αναλυτικών εφαρμογών της αέριας χρωματογραφίας
Πίνακας 6.3	Τύποι ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται στην αέρια χρωματογραφία
Πίνακας 6.4	Ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας. Ενώσεις με σταθερή θερμική αγωγιμότητα

Πίνακας 6.5	Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, μοριακή μάζα και αντίστοιχα ιόντα
Πίνακας 6.6:	Βιβλιογραφική ανασκόπηση μεθόδων GC-MS με SPME σε υδατικά δείγματα.
Πίνακας 8.1:	Ταυτοποίηση Πρότυπων Ενώσεων

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

amu	atomic mass unit
C	Concentration
CAD	Charged Aerosol Detectors
CLLE	Continuous Liquid – Liquid Extraction
EI	Electron Ionization
ELSD	Evaporative Light – Scattering Detectors
EPA	Environmental Protection Agency
FID	Flame Ionization Detector
FL	Fluorescence
FPD	Flame Photometric Detector
FT – IR	Fourier – Transform Infrared Spectroscopy
FTD	Flame Thermionic Detector
GC	Gas Chromatographic
H ₂	Hydrogen
He	Helium
HF – LPME	Hollow Fibre Liquid – Phase MicroExtraction
HPLC	High – Performance Liquid Chromatography
ISO	International Organization for Standardization
LC	Liquid Chromatography

LLE	Liquid – Liquid Extraction
MS	Mass Spectrometer
MTBE	methyl – t – butyl ether
N ₂	Nitrogen
NIOSH	National Institute for Occupational Safety and Health
NPD	Nitrogen Phosphorus Detector
PDA	Photo – Diode Array
PID	PhotoIonization Detector
RRF	Relative Response Factor
SBSE	Stirring Bar Sorptive Extraction
SIM	Selected Ion Mode
SPE	Solid – Phase Extraction
SPME	Solid – Phase MicroExtraction
TCD	Thermal Conductivity Detector
TCLP	Toxicity Characteristic Leaching Procedure
USEPA	United States Environmental Protection Agency
UV / vis	Ultraviolet / visible
UV	UltraViolet
v	velocity
VOCs	Volatile Organic Compounds

Εισαγωγή

Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs), που είναι γνωστοί και ως πολυπυρηνικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (polycyclic ή polynuclear aromatic hydrocarbons, PAH), αποτελούν οργανικές λιπόφιλες χημικές ενώσεις, που έχουν στο μόριό τους συμπυκνωμένους βενζολικούς δακτυλίους (Courter et al., 2007). Η μελέτη τους έχει συμβάλλει διαχρονικά στην κατανόηση των αρνητικών επιπτώσεων στην κατάσταση υγείας των ανθρώπων έπειτα από έκθεσή τους σε στους περιβαλλοντικούς αυτούς ρύπους (Dipple, 1985).

Οι PAH προέρχονται είτε μέσω φυσικών πηγών π.χ. πυρκαγιές, ηφαιστειακή έκλυση (Baek et al., 1991) είτε μέσω ανθρωπογενών πηγών όπως είναι η καύση του πετρελαίου (Weinstein et al., 2010). Αρκετές επιδημιολογικές μελέτες έχουν αποδείξει την σχέση ανάμεσα στην έκθεση των PAHs και την ανθρώπινη υγεία προκαλώντας επιπλοκές στην λειτουργία των πνευμόνων, των νεφρών, του ήπαρ (Kim et al., 2013, USEPA, 2008).

Λόγω της επίπτωσης τους στο περιβάλλον και στην υγεία του ανθρώπου, οι PAHs περιλαμβάνονται στον U.S. EPA (Οργανισμός Προστασίας του Περιβάλλοντος των Ηνωμένων Πολιτειών) και στους καταλόγους προτεραιότητας των ρύπων της ΕΕ (Ευρωπαϊκή Ένωση) (Keith, 2015).

Παγκοσμίως, ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων και των παράγωγών τους, πραγματοποιείται έπειτα από εκχύλιση από τρόφιμα, περιβαλλοντικά ή βιολογικά δείγματα, χρησιμοποιώντας ποικίλες αναλυτικές τεχνικές εγκεκριμένες από ορισμένες υπηρεσίες ή / και οργανισμούς. Οι αναλυτικές μέθοδοι ομαδοποιούνται σε τρεις κατηγορίες, οι οποίες συμπεριλαμβάνουν τις ανοσοχημικές, τις φασματομετρικές και τις χρωματογραφικές μεθόδους (Adeniji et al., 2017; Mahgoub, 2016).

Η εξέταση και μέτρηση των PAHs σε υδάτινους πόρους έχει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον λόγω της ανθεκτικότητάς τους στην αποικοδόμηση, της ιδιότητάς τους να μεταφέρονται σε μεγάλες αποστάσεις και των κινδύνων που ενέχουν για την ανθρώπινη υγεία (Meng et al., 2019).

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η βιβλιογραφική ανασκόπηση μεθοδολογιών προσδιορισμού για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων σε υδατικά δείγματα.

Ενότητα 1: Δομή και ιδιότητες των PAHs

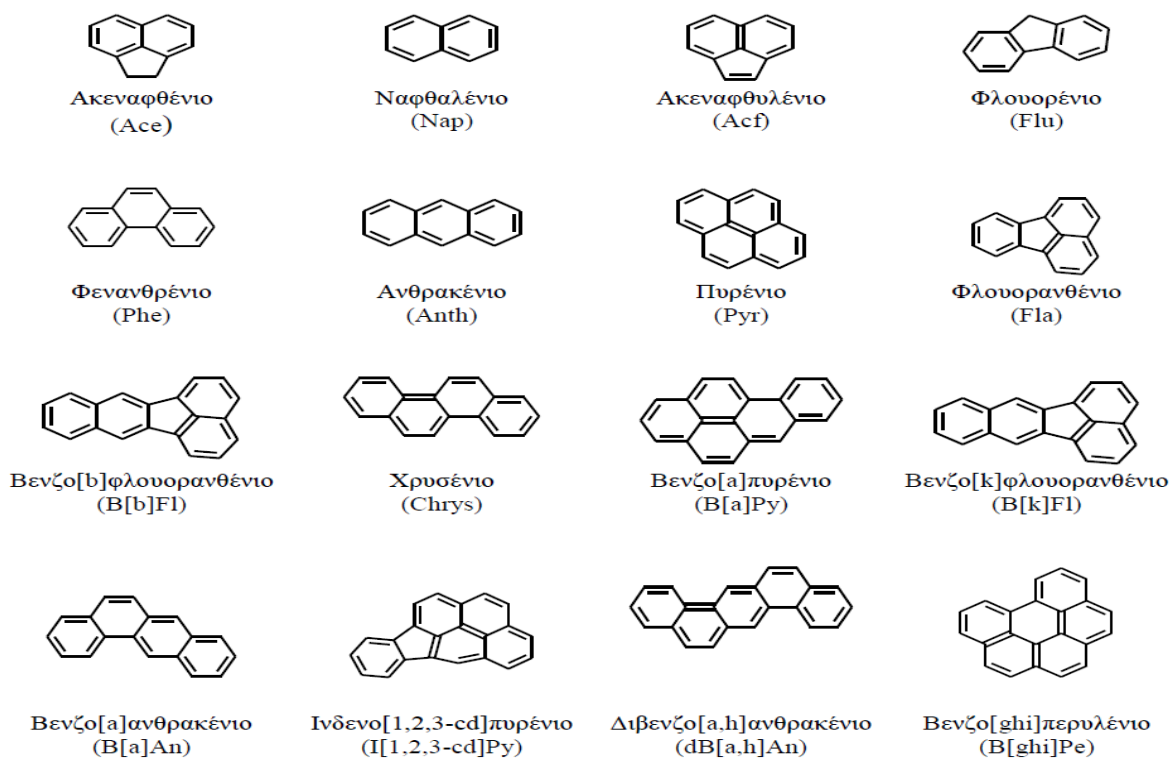
Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs), που είναι γνωστοί και ως πολυπυρηνικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (polycyclic ή polynuclear aromatic hydrocarbons, PAH), αποτελούν οργανικές λιπόφιλες χημικές ενώσεις, που έχουν στο μόριό τους συμπτυκνωμένους βενζολικούς δακτυλίους (Courter et al., 2007). Ο πιο απλός PAH είναι η χημική ένωση ναφθαλένιο, με μοριακό τύπο $C_{10}H_8$, που περιέχει δύο συμπτυκνωμένους βενζολικούς δακτυλίους. Οι PAHs διακρίνονται σε δυο βασικές κατηγορίες:

- ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους (ναφθαλένια, φλουορένια, φαινανθρένια και ανθρακένια) που περιέχουν 2-3 αρωματικούς δακτυλίους
- ενώσεις υψηλού μοριακού βάρους (χρυσένιο, κορονένιο), που περιέχουν 4-7 αρωματικούς δακτυλίους.

Είναι ενώσεις αδιάλυτες στο νερό, υψηλού σημείου ζέσεως και τάσης ατμών (Yusa et al., 2006).

Συγκρίνοντας τους PAHs με άλλους αέριους ρύπους, όπως πχ το διοξείδιο του θείου και τα οξείδια του αζώτου, παρατηρεί κανείς ότι οι PAHs βρίσκονται σε μικρότερη συγκέντρωση στον ατμοσφαιρικό αέρα, ωστόσο χαρακτηρίζονται ιδιαίτερα επικίνδυνοι για την ανθρώπινη υγεία. Χαρακτηριστικά λοιπόν, έχει διαπιστωθεί ότι οι PAHs έχουν την ικανότητα να μεταλλάσσουν το ανθρώπινο DNA και να προκαλούν βλάβη σε αυτό, καθώς μπορούν να οδηγήσουν σε καρκινογένεση, η οποία ποικίλει ανάλογα τον τρόπο επαφής του ανθρώπου με τους συγκεκριμένους αέριους ρύπους. Συγκεκριμένα, υπάρχει το ενδεχόμενο εμφάνισης καρκίνου στο πεπτικό σύστημα εξαιτίας κατανάλωσης τροφίμων, τα οποία περιέχουν ίχνη PAHs, στους πνεύμονες, λόγω εισπνοής PAHs που δημιουργούνται από το κάπνισμα και τα καυσαέρια των οχημάτων, καθώς επίσης και στο δέρμα μέσω της επαφής με πετρελαιοειδή. Συνεπώς, ο άνθρωπος μπορεί να μολυνθεί από τους PAHs είτε μέσω της αναπνοής, είτε μέσω της επαφής με μολυσμένα αντικείμενα, είτε μέσω της κατανάλωσης αντίστοιχων μολυσμένων τροφών (Kumar et al., 2016).

Η Υπηρεσία Περιβάλλοντος των Η.Π.Α. (US EPA – Environmental Protection Agency) έχει χαρακτηρίσει 16 PAHs ως ρύπους άμεσης προτεραιότητας (primary pollutants) (Σχήμα 1) και έχουν θεσπιστεί κανόνες για το μέγιστο αποδεκτό επίπεδό τους από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO – World Health Organization) (Braga et al., 2000).



Εικόνα 1.1: Η συντακτική δομή των 16 PAHs άμεσης προτεραιότητας (σύμφωνα με την U.S. EPA)

Ένα άλλο χαρακτηριστικό των PAHs είναι ότι διαλύονται σχετικά εύκολα στο νερό, καθώς δεν υπάρχει κάποιος πολικός υποκαταστάτης στο μόριό τους. Επιπρόσθετα, όλες σχεδόν οι ενώσεις των PAHs είναι στερεές σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, λόγω του αριθμού των δακτυλίων στο μόριό τους. Τα πιο πτητικά PAHs είναι σε αέρια φάση, ενώ αυτά που περιέχουν 3 – 4 δακτυλίους μπορεί να βρίσκονται είτε σε αέρια είτε σε σωματιδιακή φάση (Kumar et al., 2016).

Βέβαια, η χημική δραστηριότητα των PAHs επηρεάζεται από τους διάφορους παράγοντες, όπως ενδεικτικά τον αριθμό και τη διαταξή των δακτυλίων στο μόριό τους. Οι κυριότερες συνθήκες περιβάλλοντος, στις οποίες προκύπτουν τα παράγωγα των PAHs, είναι η φωτοοξείδωση, η αντίδραση με O₃ και η αντίδραση νίτρωσης (Franke, 1973).

Η εξέταση και μέτρηση των PAHs σε υδάτινους πόρους έχει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον λόγω της ανθεκτικότητάς τους στην αποικοδόμηση, της ιδιότητας μεταφοράς τους σε μεγάλες αποστάσεις και λόγω της επικινδυνότητας που έχουν για την ανθρώπινη υγεία (Meng et al., 2019). Οι PAHs εμπεριέχουν συνεπώς όχι μόνο λιπόφιλα συστατικά, αλλά επίσης και μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις, πχ δεσμοί υδρογόνου ή ιοντικές αλληλεπιδράσεις, κάτι που σημαίνει ότι μπορούν να προσκολληθούν σε οργανικές ενώσεις και να μεταφέρονται σε μεγάλες αποστάσεις (de Boer & Wagelmans, 2016).

Ενότητα 2: Ιστορική αναδρομή των PAHs

Η ιστορική αναδρομή των PAHs έχει αρκετό ενδιαφέρον, καθότι η μελέτη τους έχει συμβάλλει διαχρονικά στην κατανόηση των αρνητικών επιπτώσεων στην κατάσταση υγείας των ανθρώπων, από την έκθεσή τους στους περιβαλλοντικούς αυτούς ρύπους. Η πρώτη ιστορική αναφορά για τους PAHs είναι το 1775, όταν ο χειρουργός ιατρός Sir Percival Pott διαπίστωσε ότι οι περιπτώσεις εμφάνισης καρκίνου του όρχεως ήταν πολύ πιο συχνή σε αυτούς που ασκούσαν το επάγγελμα του καπνοδοχοκαθαριστή, αναπτύσσοντας μάλιστα τον ισχυρισμό ότι βασική αιτία του φαινομένου αυτού ήταν η αυξημένη έκθεσή τους σε ουσίες αιθάλης (Dipple, 1985).

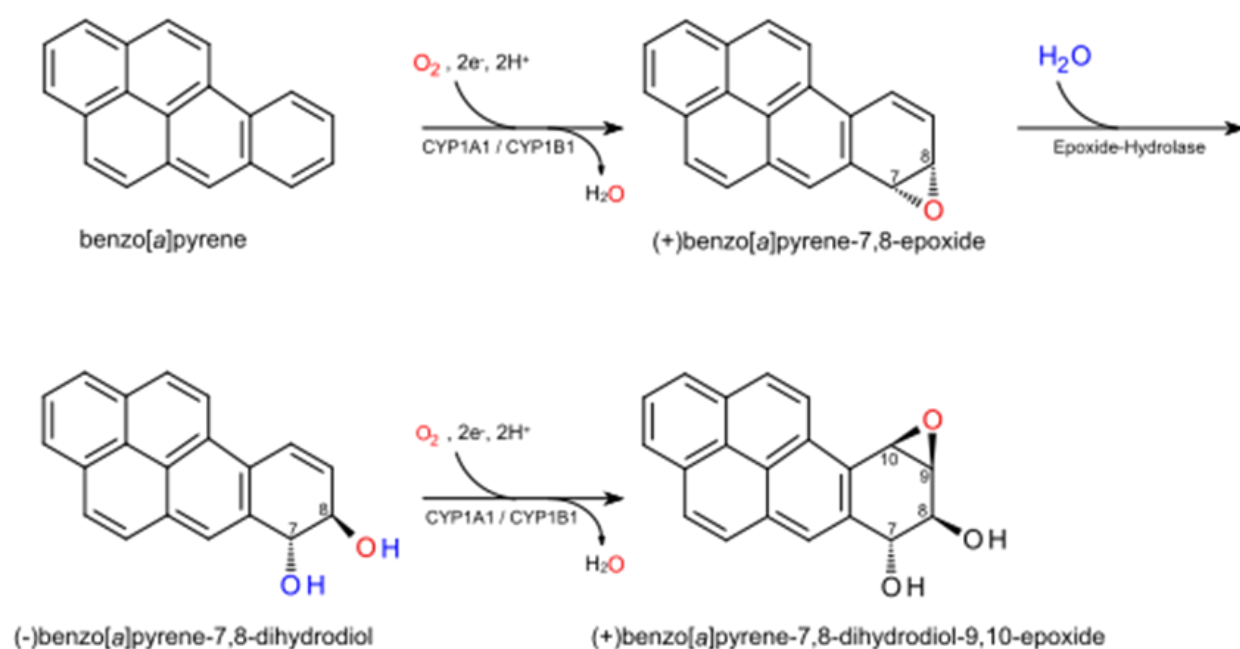
Σχεδόν έναν αιώνα αργότερα, υπήρξε αναφορά από τον Richard von Volkmann για ύπαρξη αυξημένων περιπτώσεων καρκίνου του δέρματος σε εργαζόμενους στις βιομηχανίες άνθρακα στην Γερμανία, και μάλιστα στις αρχές του 20ου αιώνα έγινε ευρέως αποδεκτή η σύνδεση των αυξημένων ποσοστών καρκίνου με την έκθεση των πασχόντων ατόμων στην αιθάλη και σε ενώσεις του άνθρακα. Μάλιστα, το 1915 αποτελεί έτος ορόσημο για την πειραματική καρκινογένεση, καθώς τότε οι Ιάπωνες ερευνητές Yamagiwa και Ichikawa κατόρθωσαν να προκαλέσουν πειραματικά καρκίνο του δέρματος σε κουνέλια, έπειτα από την επάλειψη των αυτιών τους με λιθανθρακόπισσα (Dipple, 1985).

Λίγα χρόνια αργότερα, το 1922, ο Ernest Kennaway διαπίστωσε ότι το καρκινογόνο συστατικό των μιγμάτων πίσσας και άνθρακα ήταν οργανική ένωση, η οποία αποτελείται από άτομα άνθρακα και υδρογόνου. Το συστατικό αυτό συνδέθηκε αργότερα, μέσω χρήσης συγκεκριμένου φθορίζοντος μοτίβου (fluorescent pattern), με το βενζο[α]ανθρακένιο, που είναι ένας PAH, ο οποίος αποδείχθηκε ότι προκαλεί καρκινικούς όγκους. Στη συνέχεια κατά τη δεκαετία του 1930, οι Cook, Hewett και Hieger διαπίστωσαν την ιδιαίτερα ισχυρή καρκινογόνο δράση του PAH βενζο[α]πυρενίου (Dipple, 1985).

Μεταγενέστερα της δεκαετίας του 1930, επιδημιολόγοι από την Ιαπωνία, την Μεγάλη Βρετανία και τις ΗΠΑ (συμπεριλαμβανομένου και του Richard Doll) έκαναν εκτεταμένες έρευνες όσον αφορά τη σύνδεση των PAHs με την εμφάνιση καρκινικών παθήσεων. Τα σημαντικότερα ευρήματα των ερευνών αυτών αντιστοιχούν στη διαπίστωση ότι τα ποσοστά θανάτων εξαιτίας καρκίνου του πνεύμονα ήταν υψηλότερα για εργαζόμενους που δούλευαν στη βιομηχανία αλουμινίου, σε χυτήρια σιδήρου, σε εργασίες επεξεργασίας και χρήσης ασφαλικών μιγμάτων κα, καθώς αυτοί είναι περισσότερο εκτεθειμένοι στις χημικές ενώσεις των PAHs (IARC, 1984).

Ενότητα 3: Πηγές προέλευσης των PAHs

Οι PAH εμφανίζονται στην ατμόσφαιρα σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (ng/m³), όμως το 70-90% αυτών βρίσκονται στα αιωρούμενα σωματίδια. Οι PAH προέρχονται είτε μέσω των φυσικών, είτε μέσω των ανθρωπογενών πηγών. Ο μηχανισμός σχηματισμού των PAH κατά την ατελή καύση είναι πολύπλοκος και εξαρτάται από τις υπάρχουσες συνθήκες. Στη φλόγα της καύσης δημιουργούνται ελεύθερες ρίζες μέσω πυρόλυσης, οι οποίες μπορούν να περιέχουν ένα ή και περισσότερα άτομα άνθρακα και στη συνέχεια συνδυάζονται γρήγορα μεταξύ τους σε υψηλή θερμοκρασία. Στην αναγωγική ζώνη της φλόγας (έλλειψη O₂) τα θραύσματα ενώνονται προς μερικώς συμπυκνωμένα αρωματικά μόρια (Baek et al., 1991). Στην Εικόνα 3.1 φαίνεται ο μετασχηματισμός του βενζο[α]πυρενίου σε μεταλλαξιογόνο παράγωγο.



Εικόνα 3.1: Σχηματισμός μεταλλαξιογόνου παράγωγου έπειτα ενζυμικής οξείδωσης (Alexandrov K. 2006)

3.1 Φυσικές πηγές των PAHs

Όσον αφορά τις φυσικές πηγές προέλευσης των PAHs, οι κυριότερες από αυτές σχετίζονται με τις πυρκαγιές των δασών, ενώ ακολουθούν σε σπουδαιότητα οι πηγές από την ηφαιστειακή έκλυση (Baek et al., 1991). Αναφορικά με την παρουσία των PAHs στο νερό, αυτή οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην μεταφορά των αιωρούμενων

σωματιδίων που περιέχουν PAH. Όσον αφορά την παρουσία των PAHs στο έδαφος, αυτή προκύπτει στα πλαίσια της διαδικασίας της διαγένεσης των οργανικών ιζημάτων, την πυρόλυση του ξύλου σε χαμηλές θερμοκρασίες και από τη βιολογική μετατροπή βιογενών πρόδρομων ενώσεων (Courter et al., 2007).

Γενικά, μπορεί να αναφερθεί ότι οι ποσότητες των PAHs που σχηματίζονται στην ατμόσφαιρα, είναι πολύ μεγαλύτερες από αυτές που σχηματίζονται στο νερό και στο έδαφος, με τις κυριότερες φυσικές πηγές εκπομπής των PAHs να είναι οι δασικές πηγές και η ηφαιστειακή δραστηριότητα. Ωστόσο, συμπερασματικά μπορεί να υποστηρίξει κάποιος ότι τα PAHs βρίσκονται παντού στο περιβάλλον.

3.2 Ανθρωπογενείς πηγές των PAHs

Οι ανθρωπογενείς πηγές των PAHs είναι πολύ περισσότερες από τις φυσικές πηγές, καθώς σε αυτές περιλαμβάνονται η καύση πετρελαίου και των προϊόντων του, διάφορες βιομηχανικές διαδικασίες (διύλιση πετρελαίου, παραγωγή κωκ στη χαλυβουργία, παραγωγή αλουμινίου) και η αποτέφρωση απορριμμάτων. Στους βιομηχανικής κλίμακας αποτεφρωτήρες απορριμμάτων, επιβάλλεται η τακτική ανάλυση της τέφρας (η οποία καταλήγει σε χωματερές) για την παρουσία PAH. Είναι προφανές ότι μεγάλες συγκεντρώσεις PAH στην τέφρα είναι ανεπιθύμητη και υποδεικνύει ατελή καύση λόγω ελαττωματικής λειτουργίας (Weinstein et al., 2010). Ακόμη, PAH αναμένονται να εμφανιστούν όπου γίνεται χρήση προϊόντων πίσσας (πεζοδρομίων, χώρων στάθμευσης). Σχετικά πρόσφατα έχει αρχίσει να εξετάζεται το ενδεχόμενο επιβάρυνσης των φυσικών υδάτων, από αυτού του είδους τα προϊόντα. Γενικώς, οι PAH μεταφέρονται με τα αστικά και βιομηχανικά απόβλητα, πετρελαιοειδή και λάδια, στα υδάτινα συστήματα. Λόγω της ελάχιστης διαλυτότητας στο νερό, μεγάλο τμήμα των PAH βρίσκεται στον πυθμένα ποταμών και λιμνών (Mahler et al., 2005).

Οι κύριες ανθρωπογενείς εκπομπές των PAH στην ατμόσφαιρα οφείλονται στην καύση ορυκτών καυσίμων από κινητές και σταθερές πηγές (Εικόνα 1). Τα βενζινοκίνητα και τα πετρελαιοκίνητα οχήματα καθώς τα τρένα, τα πλοία και τα αεροπλάνα υπάγονται στις κινητές πηγές, ενώ στις σταθερές πηγές ανήκουν οι μηχανές καύσης για την παραγωγή θερμότητας, ηλεκτρισμού και οι διάφορες βιομηχανικές δραστηριότητες, όπως η διύλιση του πετρελαίου, η παρασκευή ασφάλτου, αλουμινίου, χάλυβα και σιδήρου (Mahler et al., 2005).



Εικόνα 3.2: Συνήθεις πηγές πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (Πηγή: http://195.134.76.37/chemicals/images/benzopyrene/benzo_s3.jpg)

Οι PAHs βρίσκονται συνεπώς στο σύνολο του αστικού περιβάλλοντος, και συνεπώς οι άνθρωποι μπορούν να εκτεθούν στις ενώσεις αυτές με διάφορους τρόπους. Οι κυριότεροι από τους τρόπους αυτούς είναι οι εξής (Καραγκιοζίδου, 2014):

- Μέσω της αναπνοής, και ειδικότερα κυρίως από αέριους ρύπους βιομηχανιών παραγωγής πίσσας ή/και κάρβουνου, από τον καπνό του τσιγάρου, από τις εξατμίσεις των οχημάτων, καθώς επίσης και από τις αναθυμιάσεις έπειτα από την ασφαλτόστρωση των δρόμων
- Μέσω της κατανάλωσης τροφίμων, τα οποία είναι επιβαρυμένα με PAHs λόγω του τρόπου επεξεργασίας τους (όπως πχ τα καπνιστά προϊόντα)
- Μέσω της δερματικής επαφής, στην οποία είναι περισσότερο εκτεθειμένοι οι εργαζόμενοι που δουλεύουν σε βιομηχανικές διαδικασίες όπως η παραγωγή αλουμινίου, η διύλιση πετρελαιοειδών, η παραγωγή κωκ κ.α., καθώς και αυτοί που ασχολούνται σε εργασίες ασφαλτόστρωσης στους δρόμους.

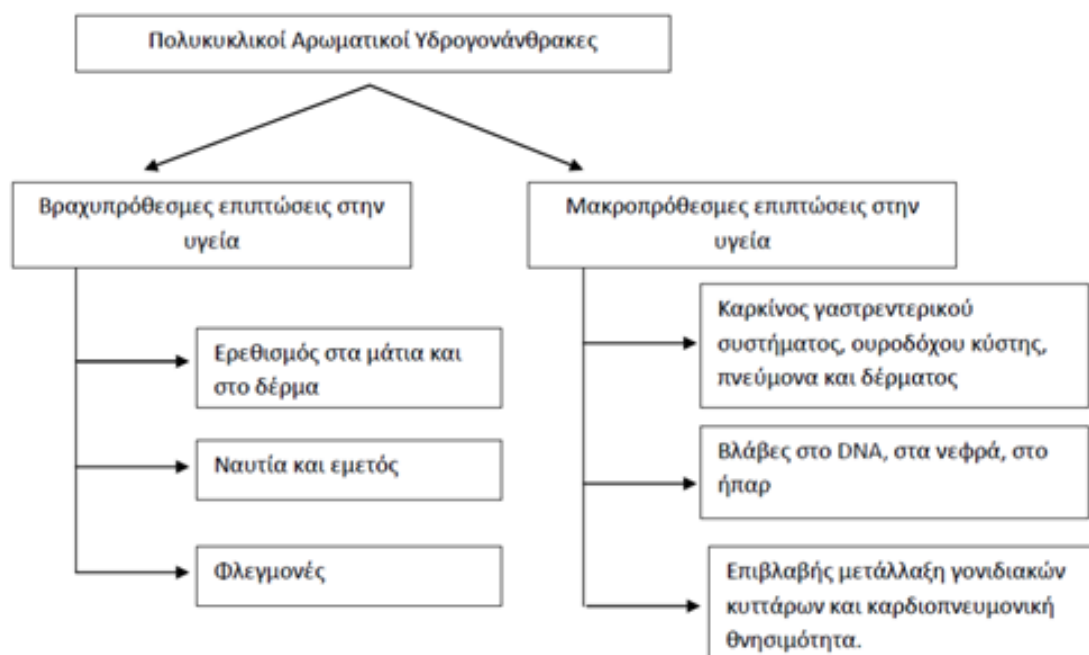
Ενότητα 4: Επιδράσεις των PAHs στην ανθρώπινη υγεία

Οι επιδράσεις των PAHs στην υγεία των ανθρώπων είναι πολυποίκιλες, καθώς υπάρχουν διάφοροι παράγοντες, οι οποίοι διαμορφώνουν το είδος των αρνητικών επιπτώσεων στον ανθρώπινο οργανισμό. Συγκεκριμένα λοιπόν, έχει διαπιστωθεί ότι οι βασικότεροι παράγοντες, οι οποίοι καθορίζουν τις επιπτώσεις των PAHs στον ανθρώπινο οργανισμό, είναι το χρονικό διάστημα που αυτός είναι εκτεθειμένος στις ουσίες αυτές, η συγκέντρωση και τοξικότητα των PAHs στους οποίους εκτίθεται ο ανθρώπινος οργανισμός, καθώς επίσης και ο τρόπος έκθεσης (μέσω αναπνευστικής οδού, στοματικής οδού και δερματικής επαφής). Επιπρόσθετα, οι αρνητικές επιπτώσεις σε έναν ανθρώπινο οργανισμό μπορεί να ποικίλλουν ανάλογα την ηλικία και προϋπάρχουσες παθήσεις του (Kim et al., 2013).

Με βάση λοιπόν τις διαπιστώσεις και τα ευρήματα από διάφορες έρευνες που έχουν διεξαχθεί, οι κυριότερες επιπτώσεις των PAHs στην ανθρώπινη υγεία είναι οι εξής:

- Επιπλοκές στην λειτουργία των πνευμόνων, εφόσον η έκθεση στους PAHs είναι μέσω της αναπνευστικής οδού, όπως πχ σκίαση στους πνεύμονες, διάχυση του υγρού που βρίσκεται στους πνεύμονες, ερεθισμός, βήχας κα. Επιπλέον, η πιο εκτεταμένη έκθεση σε PAHs μπορεί να οδηγήσει σε εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα, όπως επίσης και σε καρκίνο του δέρματος ή/και καρκίνο του γαστρεντερικού συστήματος (Kim et al., 2013)
- Επιπλοκές στην εγκυμοσύνη, σε περιπτώσεις κατά τις οποίες ανιχνευτούν ενδείξεις PAHs στον πλακούντα των εγκύων γυναικών (Al – Saleh et al., 2013)
- Αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης προφλεγμονωδών πρωτεϊνών και εμφάνισης τοξικότητας σε βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα (Koike et al., 2014)
- Παθήσεις στα νεφρά και στο ήπαρ, καθώς οι PAHs μόλις εισέλθουν στον ανθρώπινο οργανισμό, προσροφούνται στους λιπώδεις ιστούς (USEPA, 2008).

Οι επιπτώσεις των PAHs στην ανθρώπινη υγεία αποτυπώνονται ολοκληρωμένα στο παρακάτω σχήμα (Εικόνα 4.1) ως εξής:



Εικόνα 4.1: Διάγραμμα ροής για τις επιπτώσεις των PAHs στην ανθρώπινη υγεία (Πηγή: Kim et. al. 2013)

Οι 16 PAHs προτεραιότητας αποτελούν μία από τις μεγαλύτερες ομάδες μεταλλαξιογόνων ουσιών. Οι ουσίες αυτές, όμως, από μόνες τους δεν δρουν άμεσα σε ένα οργανισμό, αλλά χρειάζεται μεταβολική ενεργοποίηση, ώστε να σχηματιστούν χημικά ενδιάμεσα, τα οποία προκαλούν τη χημική καρκινογένεση. Πιστεύεται ότι ο

μεταβολισμός των PAH γίνεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, εκεί σχηματίζονται τα ασταθή εποξειδία, τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε φαινόλες. Οι φαινόλες εισέρχονται στον πυρήνα και συνδέονται με τα νουκλεϊκά οξέα, δημιουργώντας μεταλλάξεις. Έχει αποδειχθεί ότι η μεταλλαξιογόνος δράση των PAH είναι ανάλογη της ευκολίας με την οποία σχηματίζονται τα εποξειδία. Άρα όσο πιο εύκολα σχηματίζουν, τα PAH, εποξειδία, τόσο ισχυρότερη είναι η μεταλλαξιογόνος δράση τους (Courter et al., 2007).

Ενότητα 5: Νομοθεσία σχετικά με τους PAHs

Λόγω της ανησυχίας τους για το περιβάλλον και την υγεία του ανθρώπου, οι PAHs περιλαμβάνονται στον U.S. EPA (Οργανισμός Προστασίας του Περιβάλλοντος των Ηνωμένων Πολιτειών) και στους καταλόγους προτεραιότητας των ρύπων της ΕΕ (Ευρωπαϊκή Ένωση) (Keith, 2015). Έτσι, η Ευρωπαϊκή Ένωση στην οδηγία 98/83 / ΕΚ έχει καθορίσει όρια για ορισμένους PAH σε πόσιμο νερό, όπως 0,010 $\mu\text{g/L}$ για βενζο(α)πυρένιο, 1 $\mu\text{g/L}$ για το Βενζόλιο και 0,010 $\mu\text{g/L}$ για το άθροισμα βενζο(β)φθορανθένιο, βενζο(κ)φθορανθένιο, βενζο(η,θ,ι)πυρένιο και ινδενίου(1,2,3-cd)πυρένιο (Πίνακας 1). Επιπλέον, έχουν καθοριστεί τα μέγιστα επιτρεπτά όρια για τους PAHs σε διάφορα είδη επιφανειακών υδάτων, σύμφωνα με την ΚΥΑ Αρ. Γ1(δ)/ΓΠ οικ. 67322/ΦΕΚ Β' 3282/19.09.2017.

ΠΙΝΑΚΑΣ 5.1: Παραμετρικές τιμές πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAHs) στις διάφορες κατηγορίες υδάτων.

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ		ΜΟΝΑΔΕΣ	ΠΟΣΙΜΟ ΝΕΡΟ (ΦΕΚ Β' 3282/19.09.2017)	ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΑ ΥΔΑΤΑ** (ΦΕΚ 69B 2016)
				ΜΕΣ*
Βενζόλιο		$\mu\text{g/L}$	1	50
Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες	Βενζο (α)πυρένιο	$\mu\text{g/L}$	0,01	0,27
	Βενζο (b) φλουορανθένιο		0,10**	0,017
	Βενζο (k) φλουορανθένιο			0,017
	Βενζο-(g,h,i) περυλένιο			$8,2 \times 10^{-3}$
	Ινδενο (1,2,3-cd) πυρένιο			Δεν εφαρμόζεται

* ΜΕΣ: μέγιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωση

**ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΑ ΥΔΑΤΑ: Από ποταμούς, λίμνες και τα συναφή τεχνητά ή τροποποιημένα υδατικά συστήματα.

***: Άθροισμα συγκεντρώσεων των συγκεκριμένων ενώσεων βενζο(β)φθορανθένιο, βενζο(λ)φθορανθένιο, βενζο(η,θ,ι)περυλένιο, ινδενο(1,2,3-γ,δ)πυρένιο. Το Βενζο(α)πυρένιο θεωρείται δείκτης για τους άλλους PAH.

Επιπλέον, εκτός από το νομικό πλαίσιο για τα ύδατα, υπάρχει εκτενής αναφορά των PAHs και στην νομοθεσία των τροφίμων. Η επιμόλυνση των τροφίμων με PAHs μπορεί να προκύψει κατά τη διάρκεια διαδικασιών όπως η κάπνιση, η θέρμανση και η αποξήρανση ή λόγω περιβαλλοντικής ρύπανσης, ιδίως στα ψάρια, όπως ήδη έχει αναφερθεί. Με γνώμονα λοιπόν την προστασία της δημόσιας υγείας, είναι απαραίτητος ο καθορισμός των μέγιστων επιτρεπτών επιπέδων για το βενζο[a]πυρένιο σε ορισμένα τρόφιμα, που περιέχουν λίπη και έλαια, όπως επίσης και στα τρόφιμα στα οποία τα υψηλά επίπεδα επιμόλυνσης οφείλονται στις διαδικασίες κάπνισης ή αποξήρανσης. Τα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα αφορούν τα τρόφιμα στα οποία τα υψηλά επίπεδα επιμόλυνσης ενδέχεται να οφείλονται σε

περιβαλλοντική ρύπανση, ιδίως στα ψάρια και στα προϊόντα αλιείας, ως αποτέλεσμα, παραδείγματος χάριν, περιστατικών ρύπανσης λόγω διαρροής πετρελαίου στη θάλασσα (Beyer et al., 2010). Τα μέγιστα επιτρεπτά όρια των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων στα τρόφιμα σύμφωνα με τον Κανονισμό 1881/2006 παρουσιάζονται στο πίνακα 5.2.

ΠΙΝΑΚΑΣ 5.2: Παραμετρικές τιμές πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAHs) στις διάφορες κατηγορίες τροφίμων βάσει του Καν.1881/2006.

Τρόφιμα		Μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα (μg/kg) νωπού προϊόντος ^(*)
6.1.7, 6.1.8, 6.1.8	Μεταποιημένα τρόφιμα με βάση τα δημητριακά και παιδικές τροφές για βρέφη και μικρά παιδιά, παρασκευάσματα για βρέφη, διαιτητικά τρόφιμα για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς	1,0
6.1.1, 6.1.4	Έλαια και λίπη για άμεση κατανάλωση Σάρκα ψαριών, εκτός από τα καπνιστά ψάρια	2,0
6.1.2, 6.1.3, 6.1.5,	Καπνιστά κρέατα και καπνιστά προϊόντα με βάση το κρέας, Σάρκα καπνιστών ψαριών και καπνιστά προϊόντα αλιείας, εξαιρουμένων των διθύρων μαλακίων. Μαλακόστρακα, κεφαλόποδα, εκτός από τα καπνιστά.	5,0
6.1.6	δίθυρα μαλάκια (νωπά, διατηρημένα με απλή ψύξη ή κατεψυγμένα).	10,0

*Το βενζο[α]πυρένιο, για το οποίο παρατίθενται τα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα, χρησιμοποιείται ως δείκτης για την εμφάνιση και την επίπτωση των καρκινογόνων πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων. Συνεπώς, τα μέτρα αυτά παρέχουν πλήρη εναρμόνιση όσον αφορά τους πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες στα απαριθμούμενα τρόφιμα σε όλα τα κράτη μέλη.

Ενότητα 6: Ενόργανη ανάλυση των PAHs

Οι PAHs, λόγω της χαμηλής διαλυτότητάς τους, εμφανίζονται σε ίχνη σε διάφορα δείγματα (αέρα, εδάφους, τροφίμων, νερού) (Kouzayha et al., 2011). Ως εκ τούτου, η χρησιμοποιούμενη αναλυτική μέθοδος πρέπει να περιλαμβάνει υψηλής – ποιότητας παράγοντες εμπλουτισμού με στόχο τη στόχευση των ενώσεων και την προ – συγκέντρωσή τους σε επίπεδα τα οποία μπορούν να ανιχνευθούν με τη χρήση ενός αναλυτικού οργάνου (Sibiya, 2012). Επίσης, για την ανάκτηση των PAHs, κρίνεται απαραίτητη η εγκυρότητα της μεθόδου ώστε να δειχθεί η αποτελεσματικότητα των διαδικασιών εκχύλισης των (Nekhavhambe et al., 2014). Παρακάτω θα περιγραφούν ορισμένες πτυχές της τυποποιημένης προετοιμασίας και την κατάλληλης ενόργανης συνθήκης για τον ποσοτικό προσδιορισμό ορισμένων PAHs που ευρίσκονται στη λίστα – προτεραιότητας της Υπηρεσίας Προστασίας του Περιβάλλοντος

(Environmental Protection Agency, EPA) των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής (Mahgoub, 2016).

6.1 Προετοιμασία Πρότυπων Διαλυμάτων

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των PAHs πρέπει να πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας διαλύματα βαθμονόμησης (calibration solutions) τα οποία παρασκευάζονται από πιστοποιημένους PAHs. Ένας αριθμός προμηθευτών χημικών προϊόντων, όπως οι εταιρείες Sigma Aldrich, Supelco και Alfa Aesar, παρέχουν τυποποιημένους PAHs. Αξίζει να σημειωθεί ότι η επιθυμητή καθαρότητα του υλικού αναφοράς των PAHs θα πρέπει να αγγίζει το 100%. Τα απαραίτητα τυποποιημένα / πρότυπα διαλύματα για τον ποσοτικό προσδιορισμό των PAHs είναι τα ακόλουθα (Mahgoub, 2016):

1. Πρότυπο βαθμονόμησης (Calibration Standard)

Το μέσο που χρησιμοποιείται θα πρέπει να βαθμονομείται βάσει του εκάστοτε αναλυτή – στόχου. Σε αυτή την περίπτωση, απαιτείται ένα μείγμα PAHs με γνωστή συγκέντρωση για την προετοιμασία διαλυμάτων βαθμονόμησης σε πέντε συγκεντρώσεις (από το πιο αραιωμένο στο πιο συμπυκνωμένο). Αυτά τα διαλύματα βαθμονόμησης χρησιμοποιούνται για τον σχεδιασμό μίας καμπύλης βαθμονόμησης, σε επιλεγμένη περιοχή συγκεντρώσεων, για τον ποσοτικό προσδιορισμό κάθε PAH (Mahgoub, 2016).

2. Πρότυπο ανάκτησης (Surrogate Standard)

Το πρότυπο ανάκτησης θα πρέπει να προστίθεται, πριν από την εκχύλιση, σε όλα τα δείγματα που υποβάλλονται τόσο σε ποσοτικό όσο και σε ποιοτικό έλεγχο. Διακριτά πρότυπα ανάκτησης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να διορθώσουν συγκεκριμένες συγκεντρώσεις αναλύτη με βάση τους χρόνους κατακράτησης (Mahgoub, 2016).

3. Εσωτερικό πρότυπο (Internal Standard)

Το εσωτερικό πρότυπο που ονομάζεται επίσης πρότυπο – αναφοράς, είναι μία χημική ουσία που προστίθεται – σε σταθερή ποσότητα – σε όλα τα δείγματα, λίγο πριν από την ενόργανη ανάλυση, με στόχο την ποσοτικοποίηση των κορυφών των PAHs, βάσει της κορυφής του εσωτερικού προτύπου. Ειδικότερα χρησιμοποιείται για το σχεδιασμό της καμπύλης βαθμονόμησης βάσει του λόγου του σήματος της προσδιοριζόμενης ουσίας προς το σήμα του εσωτερικού προτύπου ως συνάρτηση της συγκέντρωσης των προσδιοριζόμενων ουσιών των προτύπων. Επιπρόσθετα, στη χρωματογραφία, τα εσωτερικά πρότυπα χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό της συγκέντρωσης άλλων αναλυόμενων ουσιών (αναλυτών – στόχων) υπολογίζοντας τον παράγοντα απόκρισης (Mahgoub, 2016).

Οι σημαντικότερες ιδιότητες του εσωτερικού προτύπου είναι: (α) πρέπει να συμπεριφέρεται παρόμοια με τον αναλυτή, δηλαδή να έχει παρόμοια

παραγωγιμοποίηση και παρόμοιο χρόνο κατακράτησης (β) δεν πρέπει να εντοπίζεται στο ίδιο το δείγμα, και κατά επέκταση δεν θα πρέπει να επηρεάζει τα συστατικά του δείγματος (γ) η συγκέντρωση του εσωτερικού προτύπου που προστίθεται στο δείγμα πρέπει να είναι κατά προτίμηση στη μέση τιμή του εύρους της αναμενόμενης συγκέντρωσης της αναλυόμενης ουσίας και (δ) πρέπει να είναι σταθερό. Τα εσωτερικά πρότυπα που χρησιμοποιούνται σε διαλύματα PAHs περιλαμβάνουν το ναφθαλένιο – d8, το ακεναφθυλενένιο 10, το φαινανθρένιο – d10, το χρυσένιο – d12, το περυλένιο – d12, το φλουορένιο – d10, το πυρένιο – d10 και το benzo [a] πυρένιο – 12 (Mahgoub, 2016).

6.2 Μέθοδοι Εκχύλισης

Η προετοιμασία του δείγματος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο για την επιτυχή εκτέλεση μεθόδων ποσοτικής και ποιοτικής ανάλυσης διαφόρων αναλυτών, ιδιαίτερα στην περίπτωση ανάλυσης σύνθετων δειγμάτων. Κατά κανόνα, τα περισσότερα πρωτόκολλα προετοιμασίας ενός δείγματος εμπεριέχουν και ένα βήμα εκχύλισης, το οποίο έχει ως στόχο την μεταφορά των αναλυτών – στόχων σε μία φάση πιο συμβατή με το σύστημα του οργάνου, την συγκέντρωση των διαλυμένων ουσιών – εάν αυτές είναι παρούσες σε επίπεδα ιχνών – στις μήτρες και την εξάλειψη των ανεπιθύμητων παρεμβολών (Nogueira, 2015).

Ως εκ τούτου, έχουν αναπτυχθεί και εφαρμοστεί διαφορετικές μεθοδολογίες και τεχνικές για την εξαγωγή, τον προσδιορισμό και την ποσοτικοποίηση των PAHs που ευρίσκονται σε υδάτινα δείγματα, οι οποίες περιλαμβάνουν την εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid – Phase Extraction, SPE), την εκχύλιση υγρού – υγρού (Liquid – Liquid Extraction, LLE), την συνεχή εκχύλιση υγρής φάσης (Continuous Liquid – Liquid Extraction, CLLE), την μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (Solid – Phase MicroExtraction, SPME), την μικροεκχύλιση υγρής φάσης κοίλης ίνας (Hollow Fibre Liquid – Phase MicroExtraction, HF – LPME) και την εκχύλιση με προσροφητική ράβδο ανάδευσης (Stirring Bar Sorptive Extraction, SBSE) (Bispo et al., 2011; Ma et al., 2010, Sibiya, 2012).

Οι δύο πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδους εκχύλισης, τις οποίες συνιστούν επίσης η Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος των Ηνωμένων Πολιτειών για την προ – ποσοτικοποίηση των PAHs σε δείγματα πόσιμου νερού είναι η LLE, η SPME και η SPME (Adeniji et al., 2017).

6.2.1 Εκχύλιση υγρού – υγρού (Liquid – Liquid Extraction, LLE)

Η εκχύλιση υγρού – υγρού (Liquid – Liquid Extraction, LLE) είναι μία διεργασία διαχωρισμού της διαλυμένης ουσίας – δηλαδή ενός συστατικού υγρού διαλύματος – δια επαφής και μεταφοράς μάζας αυτής σε άλλο ειδικό υγρό διαλύτη. Ας σημειωθεί ότι οι δύο υγρές φάσεις (διάλυμα – ειδικός διαλύτης) πρέπει να είναι διακριτές μεταξύ

τους και να μην αναμειγνύονται. Υπάρχουν δύο προϋποθέσεις για την πραγματοποίηση της εκχύλισης υγρού-υγρού: τα συστατικά που πρέπει να ανακτηθούν από την τροφοδοσία να διανέμονται κατά προτίμηση στον διαλύτη και οι φάσεις τροφοδοσίας και διαλύτη πρέπει να είναι ουσιαστικά μη αναμίξιμες. Η διεργασία πραγματοποιείται κατά κανόνα σε στήλες, κατά τις οποίες ο διαλύτης και το υγρό δείγμα ρέουν κατ' αντιρροή. Στην περίπτωση του διαλύτη, θα πρέπει να επιλεγθεί ο κατάλληλος, να μην είναι τοξικός, να είναι ευκόλως ανακυκλώσιμος, φθηνός και αναμίξιμος μόνο με το συστατικό προς διαχωρισμό και όχι με τα άλλα συστατικά της τροφοδοσίας. Το βασικό μειονέκτημα της εκχύλισης υγρού – υγρού είναι η απαίτηση τεράστιων όγκων διαλύτη σε συνδυασμό με τον δαπάνη αρκετού χρόνου για την ολοκλήρωσή της (Γεντεκάκης, 2010).

Οι Kyra A. et. al. (Kyra A., et. al., 2021) αξιολόγησαν δώδεκα δείγματα υγρών εκροών πριν από την επεξεργασία και μετά από επεξεργασία από το εργοστάσιο επεξεργασίας λυμάτων Penn State University Park (WWTP) χρησιμοποιώντας GC × GC συγκρίνοντας δύο μεθοδολογίες την LLE και την SBSE στοχεύοντας στην ανίχνευση των PAHs. Συμπεραίνοντας ότι η LLE είναι μια πιο αποτελεσματική μέθοδος για επαρκή ανάκτηση (> 70%) των PAHs και μπορεί να εφαρμοστεί για την ποσοτικοποίηση αυτών των ρύπων.

Tehranirokh M. et.al. (Tehranirokh M. et.al., 2021) πραγματοποίησαν έρευνα σε τρεις διαφορετικές εκδοχές σύριγγας micromixer με εκχύλιση LLE σε υδατικά δείγματα για την ανίχνευση των PAHs χρησιμοποιώντας GC-MS.

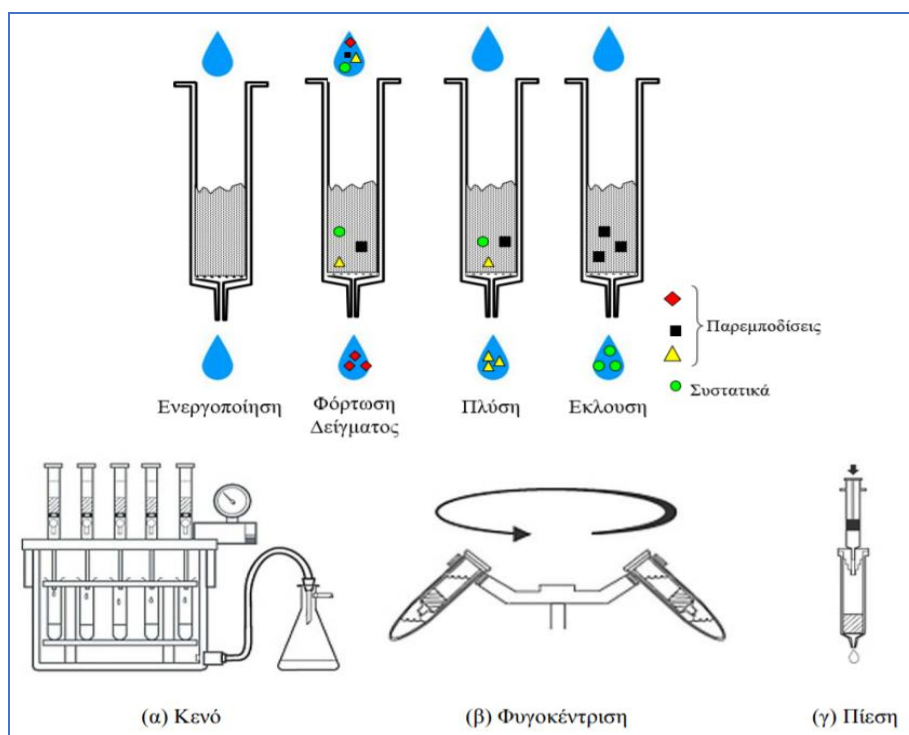
6.2.2 Εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid – Phase Extraction, SPE)

Η αρχή της εκχύλισης στερεάς φάσης (Solid – Phase Extraction, SPE) περιλαμβάνει την κατανομή των εκχυλιζόμενων συστατικών στην στερεή (προσροφητικό υλικό) και την υγρή (υπόστρωμα) φάση. Κατά τη διάρκεια της διεργασίας οι – προς διερεύνηση – ενώσεις εμφανίζουν μεγαλύτερη συγγένεια με τις ομάδες της στερεάς φάσης και, ως εκ τούτου, διαχωρίζονται. Έπειτα, η ανάκτηση των ενώσεων – στόχων από το στερεό υπόστρωμα πραγματοποιείται με τη χρήση κατάλληλων διαλυτών. Συνοπτικά, η εκχύλιση στερεάς φάσης περιλαμβάνει τα εξής στάδια (Σαμανίδου, 2015) (Εικόνα 6.1):

1. Ενεργοποίηση προσροφητικού υλικού
2. Φόρτωση δείγματος
3. Έκπλυση, για την απομάκρυνση των μη – επιθυμητών πολικών συστατικών
4. Έκλουση του δείγματος με κατάλληλο διαλύτη
5. Εξάτμιση του διαλύτη

Η εκχύλιση στερεάς φάσης είναι ευρέως διαδομένη μεταξύ των διαφόρων μεθόδων ποσοτικής και ποιοτικής ανάλυσης, καθώς χρησιμοποιεί μικρούς όγκους διαλυτών, μπορεί να αυτοματοποιηθεί επιτυγχάνοντας μεγαλύτερο αριθμό αναλυόμενων δειγμάτων, δρα συνδυαστικά με διάφορες χρωματογραφικές μεθόδους, παρέχει επαρκή καθαρισμό του δείγματος, αποδίδει αυξημένη ευαισθησία στην ανάλυση

καθώς κατά τη διάρκειά της επιτυγχάνεται προ – συγκέντρωση συστατικών, προσδίδει υψηλά ποσοστά ανάκτηση και τέλος επιδεικνύει καλή επαναληψιμότητα. (Σαμανίδου, 2015).



Εικόνα 6.1: Στάδια και τρόποι εφαρμογής της εκχύλισης στερεάς φάσης. *Πηγή: Σαμανίδου, 2015*

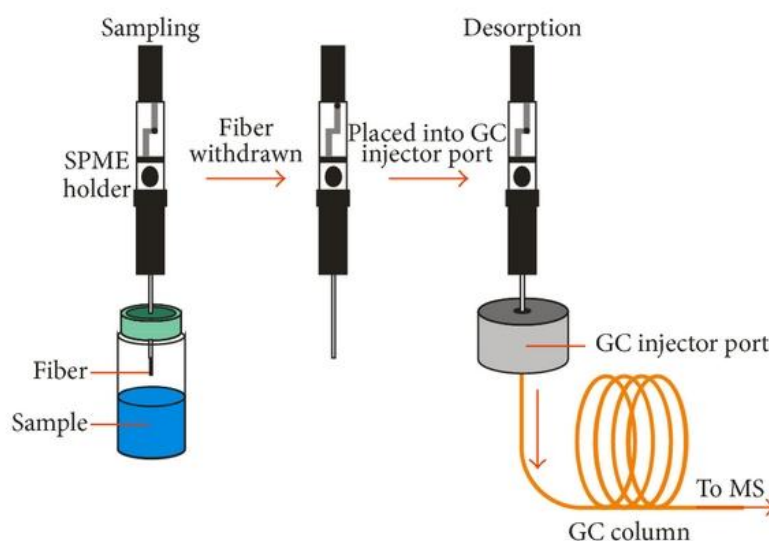
Siemers A. et.al. (Siemers A. et.al. 2015) ανέπτυξαν δύο διαφορετικές μέθοδοι για την εξαγωγή συνολικά 86 ουσιών που περιέχουν ετεροκυκλικά PAH, αλκυλιωμένα PAHs, EPA-PAHs και φαινόλες ταυτόχρονα από δείγματα νερού. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της πλειονότητας των ουσιών πραγματοποιήθηκε από το GC-MS με εκχύλιση SPE.

Portet-Koltalo F. et.al. (Portet-Koltalo F. et.al 2007) πραγματοποίησαν ποσοτικό προσδιορισμό των PAHs που υπάρχουν σε επίπεδα ιχνών στη ροή του αέρα με εκχύλιση SPE και ανάλυση με HPLC.

6.2.3 Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SOLID-PHASE MICROEXTRACTION-SPME)

Πρόκειται για μία τεχνική η οποία εξαλείφει την ανάγκη για οργανικούς διαλύτες ενώ παράλληλα επιτρέπει την απλοποίηση της διαδικασίας απομόνωσης πτητικών και μη

πτητικών ενώσεων σε υγρά ή αέρια δείγματα. Περιλαμβάνει τη χρήση ίνας, επικαλυμμένης με τη φάση της εκχύλισης που αποτελείται από καθαρό πολυμερές ή από προσροφητικά μόρια ενσωματωμένα σε πολυμερές. Με τη βοήθεια αυτής της επικάλυψης, απομονώνονται οι επιθυμητές ουσίες από τα δείγματα. Συνήθως, η τεχνική αυτή συνδυάζεται με την GC-MS για ανάλυση ενώσεων, οπότε μετά την απομόνωση αυτών, ακολουθεί εισαγωγή της ίνας στον αναλυτή για εκρόφηση και ανάλυση (Εικόνα 6.2).



Εικόνα 6.2: Απεικόνιση της γενικής λειτουργίας και των σταδίων της SPME.

Helvécio C. et.al. (Helvécio C. et.al. 2013) πραγματοποίησαν ανάλυση νερού με GC-MS ανιχνεύοντας PAHs με εκχύλιση SPME.

Kędziora-Koch et.al. (Kędziora-Koch et.al.2019) πραγματοποίησαν ανάλυση υδατικών δειγμάτων με GC-MS ανιχνεύοντας PAHs με εκχύλιση SPME.

6.3 ΕΝΟΡΓΑΝΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Παγκοσμίως, ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων και των παράγωγων τους, πραγματοποιείται έπειτα από εκχύλιση από τρόφιμα, περιβαλλοντικά ή βιολογικά δείγματα, χρησιμοποιώντας ποικίλες αναλυτικές τεχνικές εγκεκριμένες από ορισμένες υπηρεσίες ή / και οργανισμούς όπως η Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος των Ηνωμένων Πολιτειών (United States Environmental Protection Agency, USEPA), ο Διεθνής Οργανισμός Τυποποίησης (International Organization for Standardization, ISO) και το Εθνικό Ινστιτούτο Επαγγελματικής Ασφάλειας και Υγείας (National Institute for

Occupational Safety and Health, NIOSH). Βιβλιογραφική ανασκόπηση αναλυτικών μεθόδων, οι οποίες συμπεριλαμβάνουν τις ανοσοχημικές, τις φασματομετρικές και τις χρωματογραφικές μεθόδους (Πίνακας 6.1).

Τα δείγματα συνήθως εξάγονται και «καθαρίζονται» με οργανικούς διαλύτες και αναλύονται για την περιεκτικότητα σε ΠΑΥ με χρωματογραφικές τεχνικές σε συνδυασμό με ποικιλία ευαίσθητων ανιχνευτών. Η υπεριώδης απορρόφηση και η φασματοσκοπία φθορισμού είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι ανιχνευτές στα συστήματα HPLC, ενώ ο ιονισμός της φλόγας, η σύλληψη ηλεκτρονίων, οι ανιχνευτές αζώτου και τα φασματόμετρα μάζας έχουν συνδεθεί με όργανα GLC.

Ορισμένες από αυτές τις μεθόδους μέτρησης είναι πολύ ευαίσθητες και μπορούν να εντοπίσουν και να ποσοτικοποιήσουν μεμονωμένες ενώσεις ΠΑΥ, ωστόσο, οι πληροφορίες σχετικά με την έκθεση είναι συνήθως διαθέσιμες μόνο αρκετές ημέρες μετά τη δειγματοληψία, τα όργανα είναι πολύ ακριβά και η προετοιμασία των δειγμάτων είναι εντατική απαιτώντας εξειδικευμένο προσωπικό, επομένως πολύ δαπανηρή. Αν και αυτή η προσέγγιση προσφέρει τόσο καλή ευαισθησία όσο και δεδομένα καλής ποιότητας, τα αποτελέσματα σπάνια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταχεία ανταπόκριση σε δυνητικά επιβλαβείς εκθέσεις.

Συνεπώς, προκύπτει η απαίτηση για μεθόδους που μπορούν να εκτιμήσουν με ακρίβεια και σε πραγματικό χρόνο ή τουλάχιστον εντός λεπτών από την έκθεση τους. Τα τελευταία 10 χρόνια, αυτή ήταν η ώθηση ορισμένων ερευνών και οδήγησε στην ανάπτυξη ορισμένων νέων τεχνικών άμεσης σημασίας για την παρακολούθηση αυτών των τοξικών ενώσεων. Οι πιο ελπιδοφόρες από τις νέες τεχνικές (ορισμένες απειριθμούνται στον πίνακα 6.1) χρησιμοποιούν την αρχή *synchronous luminescence* (SL), *room temperature phosphorescence* (RTP), και η υπεριώδης φασματοσκοπία.

Αυτές οι τεχνικές είναι πολύ ευαίσθητες, εξασφαλίζοντας την ανίχνευση πολύ χαμηλών συγκεντρώσεων και, επιπλέον, μπορούν να παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την περιεκτικότητα σε ΠΑΥ δείγματος.

Πίνακας 6.1: Αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των PAHs σε διάφορα δείγματα.

A/A	Μέθοδος	Δείγμα	Πηγή
1	Φασματοσκοπία Φθορισμού	Νερό	(Baumard, Budzinski et al. 1998)
2	Φωτομετρικά	Τρόφιμα	(Wenzl, Simon et al., 2006)
3	IR	Περιβαλλοντικά δείγματα	(Scott A. et al. 2015, Tommasini M., Lucotti A., et al. 2016)
4	HPLC-fluorescence	Δείγματα εσωτερικού χώρου αέρα	(Liaud, Millet et al. 2015)

A/A	Μέθοδος	Δείγμα	Πηγή
5	GC-MS	Καβουρδισμένου καφέ	(Guatemala-Morales, Beltrán-Medina et al. 2016)
6	GC-MS/MS	Νερό Λίμνης	(Zhi, Zhao et al. 2015)
7	HPLC and MS	Ιζήματα	(Viguri, Verde et al. 2002)
8	Φασματοσκοπία Φθορισμού	Υγρά απόβλητα	(Aemig, Chéron et al., 2016)
9	HPLC-fluorescence	Τζημα λιμνών μετά από πυρκαγιά	(Denis, Toney et al. 2012)
10	LDM (localization- delocalization matrix	Νερό	(Sumar, Cook et al. 2015)
11	Gaschromatography-triple quadrupole mass spectrometry	Φρούτα και Λαχανικά	(Banerjee et al., 2012)
12	Near-Infrared (NIR)	Αέρα	(Mattioda et al. 2005)
13	GC/MS	Ιζήματα	(Retnam, Zakaria et al. 2013)
14	HPLC-fluorescence	Δείγματα εσωτερικού χώρου αέρα	(Liaud, Millet et al. 2015)
15	Miniaturized membrane inlet mass spectrometer (mini-MIMS)	Εδαφικά δείγματα	(Janfelt et al. 2008)
16	Two-dimensional fluorescence correlation spectroscopy	Νερό	(Zhou, Zhao et al. 2016)
17	Polythiophene sensors	Αέρα	(Tiu, Krupadam et al. 2016)
18	LC-MS/MS	Απόβλητα	(Pitarch, Cervera et al. 2016)
19	HPLC with fluorescence and chemiluminescence detections,	Αέρα	(Hayakawa, 2018)
20	UHPLC-MS/MS	Κρέατα	(Han, Sapozhnikova et al. 2016)
21	Graphene nanosensor	Υδατικά Δείγματα	(Church, Wang et al. 2016)

Οι ανοσοχημικές μέθοδοι (EPA 4030 και 4035, Update III), δεν είναι πολύ δημοφιλείς λόγω της τάσης να εισάγουν ισχυρά συστηματικά σφάλματα στα τελικά αποτελέσματα. Εκτός από την ακρίβεια, η ορθότητα και η συγγένεια των μεθόδων για πολλές αρωματικές ενώσεις είναι σημαντικά χαμηλότερες από αυτές που θα μπορούσαν να ληφθούν από άλλες πρότυπες μεθόδους. Ως εκ τούτου, χρησιμοποιούνται κυρίως για τον έλεγχο και την ανάλυση του εδάφους και του νερού (Adeniji et al., 2014; Adeniji et al., 2017).

Μεταξύ των φωτομετρικών μεθόδων, διακρίνονται οι μέθοδοι με υπεριώδη (UltraViolet, UV) και υπέρυθρη (Infrared, IR) ακτινοβολία. Ωστόσο, οι UV μέθοδοι παρόλο που θεωρούνται ευαίσθητες και επιλεκτικές για αρωματικές ενώσεις, όπως οι PAHs, επηρεάζονται συχνότερα από παρεμβολές λόγω της παρουσίας ορισμένων άλλων ενώσεων, όπως λιπιδίων, στη μήτρα του δείγματος. Ομοίως, οι φασματομετρική μέθοδος με IR, η οποία παρόλο που είναι ταχεία και φθηνή, απαιτεί το δείγμα να υποβληθεί σε υποχρεωτικό βήμα καθαρισμού μετά την εκχύλιση και πριν από τον αναλυτικό προσδιορισμό και επίσης δεν είναι επαρκώς επιλεκτική (Adeniji et al., 2017; Pavlova and Ivanova, 2003).

Οι μέθοδοι υγρής και αέριας χρωματογραφίας χρησιμοποιούνται συχνότερα για την ανάλυση των PAHs, παρά το γεγονός ότι είναι πιο ακριβές και πιο χρονοβόρες (Kumar et al., 2014; Pampanin et al., 2013). Οι διαθέσιμες μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας (Liquid Chromatography, LC) περιλαμβάνουν την υψηλής – απόδοσης υγρή χρωματογραφία (High – Performance Liquid Chromatography, HPLC) με μία σειρά ανιχνευτών UV και φθορισμού (Fluorescence, FL) (EPA 550, 610 και 8310, NIOSH 5506 και 5800) (Adeniji et al., 2017), σε συνδυασμό με φασματομέτρο μάζας (Cai et al., 2009), με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (Photo – Diode Array, PDA) και με συνδυασμό ανιχνευτών PDA και φθορισμού (ISO 17993) (Adeniji et al., 2017; Mahgoub, 2016).

Οι μέθοδοι αέριας χρωματογραφίας (Gas Chromatographic, GC) θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν, μετά τις – προτεινόμενες από την EPA – διαδικασίες οργανικής εκχύλισης, σε συνδυασμό με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (Flame Ionization Detector, FID) (EPA 610 και 8100, NIOSH 5515), ανιχνευτή υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (Fourier – Transform Infrared Spectroscopy, FTIR) (EPA 8410), με φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS) (EPA 525, 625 και 8720, ISO 18287, ISO / DTS 28581, ISO / FDIS 28540 και EN 15527), ή φασματομετρία μάζας σε συνδυασμό με θερμική εκρόφηση (EPA 8275) (Adeniji et al., 2017; Mahgoub, 2016).

Σύμφωνα με την USEPA, τόσο η GC/MS όσο και η HPLC θεωρούνται έγκυρες για την ανάλυση των PAHs, αν και η GC/MS υπερτερεί. Συμπερασματικά, οι πιο δημοφιλείς μέθοδοι – σύμφωνα με την EPA – για τον προσδιορισμό των PAHs περιλαμβάνουν (Mahgoub, 2016):

- PA 8100 GC πληρωμένη και τριχοειδή στήλη με FID
- EPA 8310 HPLC αντίστροφης φάσης με ανιχνευτές υπεριώδους ακτινοβολίας / φθορισμού
- EPA 8270 GC / MS
- EPA 8275 θερμική εκρόφηση – GC / MS

- EPA 8410 GC, τριχοειδή στήλη FT – IR

6.3.1 Μέθοδοι Αέριας Χρωματογραφίας

Η αέρια χρωματογραφία ανήκει στις αναλυτικές μεθόδους διαχωρισμού, η οποία επινοήθηκε από τον Laureate και τους συνεργάτες του, το 1952. Πάνω από 60 έτη, τα συστήματα αέριας χρωματογραφίας εμπορεύονται ευρέως και χρησιμοποιούνται σε διάφορες βιομηχανίες, δεδομένου ότι είναι ικανές για ποιοτικές και ποσοτικές αναλύσεις επιμέρους συστατικών σε σύνθετα μείγματα. Η αρχή λειτουργίας της αέριας χρωματογραφίας βασίζεται στο διαχωρισμό των συστατικών ενός μίγματος βάσει διαφορετικής κατανομής τους μεταξύ των δύο φάσεων. Εν συντομία, η διαδικασία της αέριας χρωματογραφίας περιλαμβάνει εξάτμιση και την εισαγωγή των δειγμάτων στην κεφαλή μίας χρωματογραφικής στήλης, ακολουθούμενη από έκλυση του συστατικού, η οποία πραγματοποιείται με συνεχή ροή αδρανούς αερίου (κινητή φάση). Ας σημειωθεί ότι ο κύριος ρόλος της κινητής φάσης, και στην προκειμένη περίπτωση του αδρανούς αερίου, είναι η μετακίνηση του αναλυτή κατά μήκος της στήλης, και όχι η αλληλεπίδρασή του με τα μόρια και τα συστατικά του αναλυτή (Shimadzu, 2020).

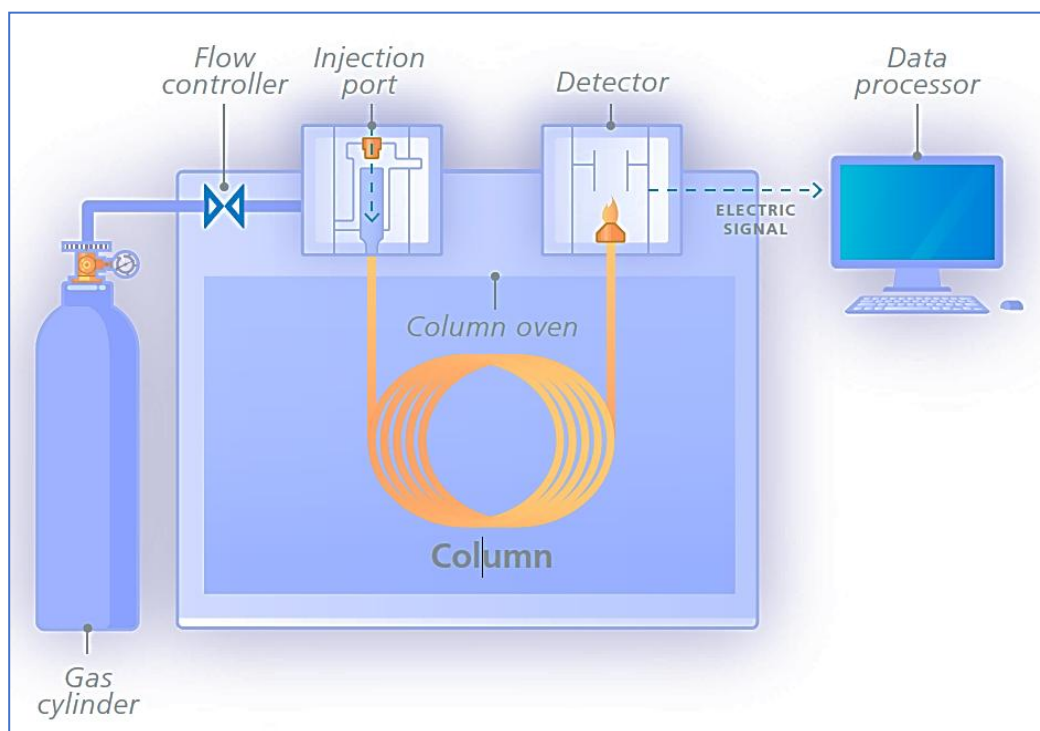
Η τεχνική της αέριας χρωματογραφίας εφαρμόζεται για πολλούς τύπους αναλύσεων, όπως την ανάλυση υπολειμματικών διαλυτών και πτητικών ουσιών σε φαρμακευτικά προϊόντα, στην ανάλυση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στην ασφάλεια τροφίμων, στον προσδιορισμό των επιπέδων ιχνών στην περιβαλλοντική ανάλυση καθώς, στις βιομηχανίες αρωματοποιίας και την στην πετρελαιοειδή και χημική βιομηχανία (Shimadzu, 2020).

Οι μέθοδοι αέριας χρωματογραφίας χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό και την ανίχνευση μη – πολικών οργανικών ενώσεων που είναι πτητικές και θερμικά σταθερές. Επίσης, χρησιμοποιούνται για την ανάλυση ορισμένων ημι – πτητικών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων των PAHs (Adeniji et al., 2017; Cheng et al., 2012). Η τεχνική μπορεί να προσφέρει υψηλό διαχωρισμό με τη χρήση τριχοειδούς στήλης. Ωστόσο, PAHs με μοριακό βάρος άνω των 300 μονάδων ατομικής μάζας (atomic mass unit, amu) είναι δύσκολο να αναλυθούν με αυτή τη μέθοδο λόγω της χαμηλής πτητικότητας, της τάσης για αποσύνθεση (λόγω υψηλής θερμοκρασίας) και της δυνατότητας προσρόφησης στη βαλβίδα εισόδου της στήλης της αέριας χρωματογραφίας (Cai et al., 2009).

6.3.1.1 Οργανολογία

Ένα τυπικό σύστημα αέριας χρωματογραφίας αποτελείται από το τμήμα ελέγχου της ροής, ένας θάλαμος έγχυσης του δείγματος, έναν θερμοστατούμενο κλίβανο με στήλη, και έναν ανιχνευτή ο οποίος είναι συνδεδεμένος σε επεξεργαστή δεδομένων

(Εικόνα 6.3). Σε ένα τέτοιο σύστημα, το φερόμενο αέριο, το οποίο αποτελεί την κινητή φάση, αποτελεί ένα ελαφρύ αδρανές αέριο όπως το ήλιο (Helium, He), το άζωτο (Nitrogen, N₂), ή το υδρογόνο (Hydrogen, H₂), που παρέχεται με έναν σταθερό ρυθμό ροής προς το δείγμα στο θάλαμο έγχυσης. Ουσιαστικά, ο αέριος χρωματογράφος αποτελείται την κινητή φάση, το σύστημα εισαγωγής δείγματος (injector), την αναλυτική στήλη, τον ανιχνευτή και το καταγραφικό (Shimadzu,



2020).

Εικόνα 6.3: Τυπική διαμόρφωση αέριου χρωματογράφου (φιάλη φέροντος αερίου, ρυθμιστής ροής, σύστημα εισαγωγής δείγματος, στήλη, θερμοστατούμενος κλίβανος, ανιχνευτής, επεξεργαστής δεδομένων). Πηγή: Shimadzu, 2020

6.3.1.2 Λειτουργία

Εν συντομία, η διαδικασία λειτουργίας του αέριου χρωματογράφου έχει ως εξής: το δείγμα εισάγεται στον θάλαμο έγχυσης, εξατμίζεται και κατευθύνεται προς τη στήλη με το φερόμενο αέριο (εντός θερμοστατούμενου κλιβάνου για τον έλεγχο της θερμοκρασίας). Στη στήλη, μία υγρή στατική φάση (για παράδειγμα, πολυμερές σιλικόνης) είναι χημικά επικαλυμμένη, με αποτέλεσμα το διαχωρισμό προς τα συστατικά του δείγματος εντός της στήλης. Έπειτα πραγματοποιείται έκλουση των – προς μελέτη – συστατικών και ανίχνευσή τους μέσω της παραγωγής σήματος (Cai et al., 2009).

Δεδομένου ότι η διαδικασία διαχωρισμού και κατακράτησης του δείγματος στην στατική φάση εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες του συστήματος, όπως θερμοκρασία και φύση της στήλης, ο χρόνος διαχωρισμού και ο χρόνος κατακράτησης θα είναι διαφορετικοί για κάθε ένωση. Επομένως, ακόμη και όταν εισάγονται μικρά συστατικά, ο χρόνος που απαιτείται για να φτάσουν τα στοιχεία στην έξοδο της στήλης είναι διαφορετικός και μπορεί να ανιχνευθεί και να υπολογιστεί. Η έξοδος της στήλης συνδέεται με έναν ανιχνευτή και όταν οι ουσίες από τον φερόμενο αέριο εκλούνται από τη στήλη, ο ανιχνευτής τα μετατρέπει σε ηλεκτρικά σήματα που ενισχύονται και αποστέλλονται σε έναν επεξεργαστή δεδομένων. Αναλύοντας το ηλεκτρικό σήμα του ανιχνευτή στον επεξεργαστή δεδομένων, η αέρια χρωματογραφία είναι σε θέση να αναγνωρίσει το δείγμα και να προσδιορίσει την ποσότητά του. Ο τρόπος με τον οποίο εκφράζεται ο διαχωρισμός των επιμέρους ουσιών του δείγματος, καλείται χρόνος κατακράτησης, δηλαδή ο χρόνος κατά τον οποίο η ουσία παραμένει στη στατική φάση (στήλη) και την κινητή φάση (φέρον αέριο). Ο υπολογισμός του χρόνου κατακράτησης ξεκινάει από τη στιγμή της έγχυσης του δείγματος στην στήλη έως τη στιγμή του εντοπισμού της από τον ανιχνευτή. Επιπρόσθετα, με την έγχυση ενός τυποποιημένου / πρότυπου δείγματος και ενός άγνωστου δείγματος, και την σύγκριση των χρόνων κατακράτησης, ο ποσοτικός υπολογισμός μπορεί να καταστεί δυνατός με την σύγκριση των μεγεθών των κορυφών τους (Shimadzu, 2020).

6.3.1.2 Μέθοδοι έγχυσης του δείγματος

Η εισαγωγή του δείγματος στο σύστημα αέριας χρωματογραφίας αποτελεί ένα κρίσιμο βήμα για το διαχωρισμό και πραγματοποιείται με σύριγγα, της οποίας η βελόνα τρυπάει ένα ελαστικό διάφραγμα, το οποίο ευρίσκεται εντός του εισαγωγέα. Η έγχυση του δείγματος μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε χειροκίνητα ή χρησιμοποιώντας σύστημα αυτόματης δειγματοληψίας. Αξίζει να τονιστεί ότι σημαντικά σφάλματα στην GC προκύπτουν από κακή τεχνική έγχυσης. Επίσης η θερμοκρασία του injector συνηθίζεται να είναι τέτοια ώστε το υγρό δείγμα να αεροποιείται ταχέως και να μεταφέρεται στη στήλη για διαχωρισμό. Υπάρχουν πολλές διαφορετικές μέθοδοι έγχυσης, αεριοποίησης και μεταφοράς του δείγματος στην είσοδο της αναλυτικής στήλης, στις οποίες συγκαταλέγονται (Bukhaiti et al., 2017

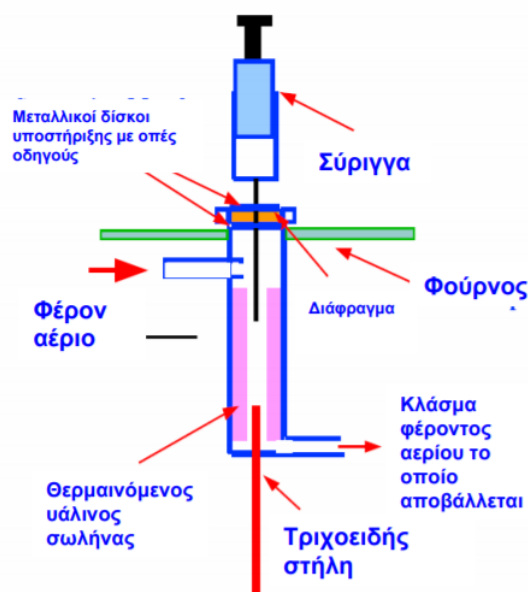
- Έγχυση διαμοιρασμού / Μη διαμοιρασμού (Split / Splitless) (Εικόνα 6.3 και 6.4)

Το υγρό μίγμα εισέρχεται σε ένα θάλαμο, όπου ένα μέρος του μόνο θα πάει προς την στήλη και το υπόλοιπο θα αποβληθεί προς το περιβάλλον από την έξοδο split. Με τον τρόπο αυτό μόνο ένα ποσοστό του μίγματος θα εισέρθει στην στήλη. Το ποσοστό αυτό καθορίζεται από τις ροές του φέροντος αερίου και της ροής στην βαλβίδα split. Η ροή στο θάλαμο θα περιλαμβάνει την ροή που πάει στη στήλη και την ροή που πάει στην βαλβίδα split.

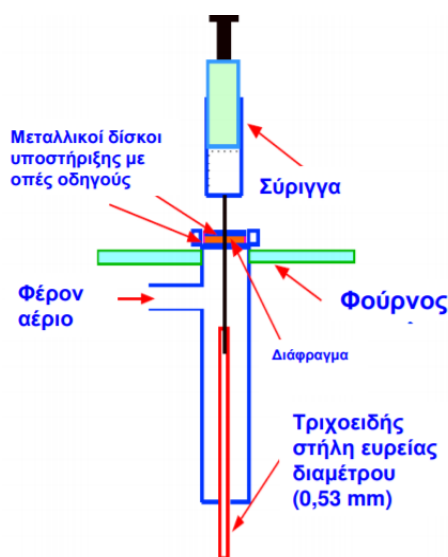
Στην περίπτωση της έγχυσης μη διαμοιρασμού, ο τρόπος λειτουργίας είναι παραπλήσιος με αυτόν του split. Υπάρχει και εδώ ένας θάλαμος, όπου εισάγεται το δείγμα, όμως η βαλβίδα split είναι κλειστή και έτσι όλο το δείγμα που εισάγεται σε αυτόν πηγαίνει στην στήλη, έτσι δεν έχουμε αραίωση του δείγματος. Η συνολική ροή του θαλάμου πρέπει να είναι παραπλήσια με την ροή της κινητής φάσης, αφού δεν έχει ροή η βαλβίδα split. Η διαφορά είναι ότι θάλαμος στο split είναι ανοικτός στο κάτω μέρος ώστε να μπορεί φεύγει η επιπλέον ροή, ενώ στο splitless είναι στενός στο τελείωμα ώστε να αποφεύγεται διαρροή του δείγματος (Klee et al., 2002; Kupiec, 2004).

- Μέθοδος άμεσης έγχυσης

Βάσει αυτής της μεθόδου η ποσότητα του υγρού δείγματος εισάγεται απευθείας στη στήλη χωρίς αεριοποίηση ή προθέρμανση. Αυτό προϋποθέτει ότι η στήλη είναι σχετικά μεγάλης διαμέτρου ώστε να μπορέσει η βελόνα της σύριγγας να εισέλθει μέσα σε αυτή. Η μέθοδος άμεσης έγχυσης ενδείκνυται για θερμο – ασταθείς ενώσεις και αποτελεί μία εξαιρετική αναλυτική τεχνική που επιτρέπει την απλή τριχοειδή ανάλυση από μία απλή δομή εισόδου.



Εικόνα 6.4: Μέθοδος έγχυσης διαμοιρασμού. Πηγή: Ε.ΜΠΑΚΕΑΣ, 2008



Εικόνα 6.5: Μέθοδος έγχυσης μη – διαμοιρασμού. Πηγή: Ε.ΜΠΑΚΕΑΣ,2008

6.3.1.3 Στήλες διαχωρισμού

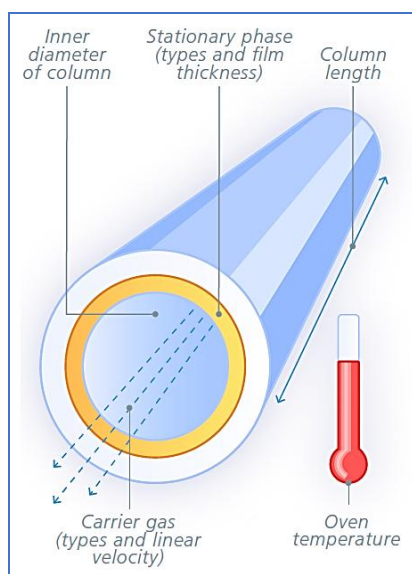
Η στήλη είναι το βασικό κομμάτι ενός χρωματογράφου. Μία κατάλληλα επιλεγμένη στήλη μπορεί να παράγει καλό χρωματογραφικό διαχωρισμό, παρέχοντας μία ακριβή και αξιόπιστη ανάλυση. Στον αντίποδα, μία στήλη που δεν χρησιμοποιείται σωστά μπορεί συχνά να προκαλέσει σύγχυση, ανεπαρκή διαχωρισμό και, ως εκ τούτου, μπορεί να οδηγήσει σε μη – έγκυρα ή πολύπλοκα – στην ερμηνεία – αποτελέσματα (Singh et al., 2013).

Υπάρχουν εκατοντάδες ενώσεις που μπορούν να αναλυθούν με αέρια χρωματογραφία. Η επιλογή της κατάλληλης στήλης, για οποιαδήποτε εφαρμογή βασίζεται σε τέσσερις σημαντικούς παράγοντες: την στατική φάση, την εσωτερική διάμετρο της στήλης, το πάχος της επίστρωσης της στατικής φάσης και το μήκος της στήλης (Εικόνα 6.6). Οι διαφορές στις χημικές και φυσικές ιδιότητες των εγχυόμενων οργανικών ενώσεων και οι αλληλεπιδράσεις τους με την στατική φάση είναι η βάση της διαδικασίας διαχωρισμού. Όταν η ισχύς των αλληλεπιδράσεων της φάσης του αναλυτή διαφέρει σημαντικά για δύο ενώσεις, η μία διατηρείται περισσότερο από την άλλη. Ο χρόνος κατακράτησης είναι ένα μέτρο αυτών των αλληλεπιδράσεων. Η αλλαγή των χημικών χαρακτηριστικών της στατικής φάσης μεταβάλλει τις φυσικές της ιδιότητες. Δύο ενώσεις που συν – εκλύονται (δεν διαχωρίζονται) σε μία συγκεκριμένη στατική φάση ενδέχεται να διαχωριστούν σε μία άλλη φάση διαφορετικής χημείας (Bukhaiti et al., 2017; Singh et al., 2013).

Δύο κύριοι τύποι στηλών διαχωρισμού χρησιμοποιούνται στην αέρια χρωματογραφία και είναι διαθέσιμες στην αγορά· οι τριχοειδείς και οι πεπληρωμένες στήλες. Οι στήλες είναι κενές στο εσωτερικό, ενώ είναι εμπλουτισμένες με κατάλληλο υλικό ενσωματωμένο στα εσωτερικά τοιχώματά τους, αποτελώντας την στατική φάση. Μία

τριχοειδής στήλη έχει συνήθως εσωτερική διάμετρο 0.1 – 0.53 mm και μήκος 10 – 105 m. Το υλικό επικάλυψης των τοιχωμάτων είναι συνήθως η τηγμένη πυριτία, με το εσωτερικό τοίχωμα να συνδέεται χημικά με την υγρή φάση. Το εξωτερικό μέρος της στήλης είναι επικαλυμμένο με ρητίνη πολυϊμιδίου για την αύξηση της έντασης. Οι τριχοειδείς στήλες παρουσιάζουν εξαιρετικό διαχωρισμό των κορυφών (οξείες κορυφές) με θεωρητικές πλάκες που κυμαίνονται από 3.000 έως 7.000 (N / m). Ο πιο συχνός τύπος στήλης είναι αυτή με εσωτερική διάμετρο 0.25 mm και μήκος 30 m (Shimadzu, 2020).

Οι πεπληρωμένες στήλες, όπως αναφέρει και το όνομά τους είναι πληρωμένες με **ομοιόμορφο** κονιοποιημένο πληρωτικό υλικό, το οποίο είναι καλυμμένο με ένα λεπτό στρώμα στατικής φάσης. Κατασκευάζονται συνήθως από γυαλί ή ανοξείδωτο χάλυβα και έχουν εσωτερική διάμετρο 2 έως 4 mm και μήκος 1 έως 4m. Η κύρια χρήση τους έγκεινται πάνω σε αέρια δείγματα, δεδομένου ότι παρουσιάζουν διεύρυνση του πλάτους των κορυφών λόγω της διάχυσής τους (Singh et al., 2013).



Εικόνα 6.6: Παράγοντες που επηρεάζουν τη συγκράτηση σε μία στήλη αέριας χρωματογραφίας. Πηγή: Shimadzu, 2020

6.3.1.4 Φέρον αέριο (κινητή φάση)

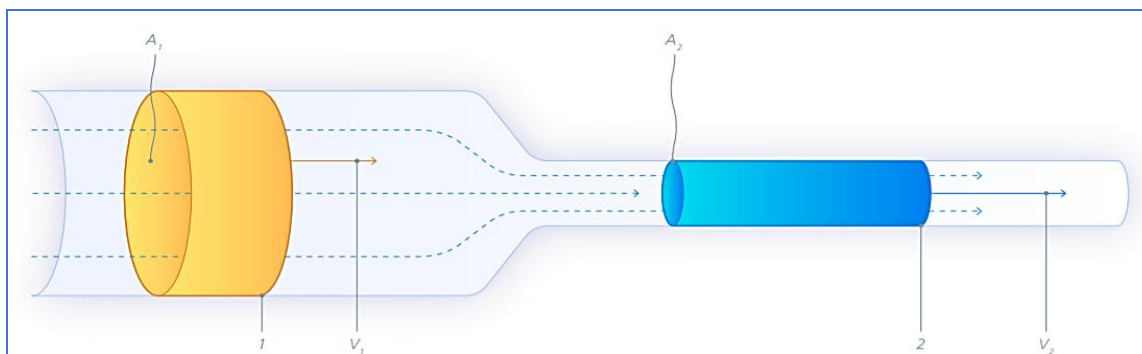
Η κινητή φάση στην αέρια χρωματογραφία αποτελεί ένα αέριο που καλείται «φέρον αέριο». Το φέρον αέριο πρέπει να είναι ένα αδρανές αέριο, το οποίο φέρει το δείγμα αλλά δεν αλληλεπιδρά με τις ενώσεις – στόχους. Τα πιο συνήθη αδρανή αέρια που χρησιμοποιούνται είναι το He, N₂, H₂, και Ar. Σε τριχοειδείς στήλες, το He προτιμάται λόγω της ικανότητάς του να διατηρεί την ανάλυση διαχωρισμού σε υψηλή γραμμική ταχύτητα (η ταχύτητα με την οποία το δείγμα «ρέει» στη στήλη). Εντούτοις, βαθμιαία, το ήλιο αντικαθίσταται από το υδρογόνο, το οποίο διακρίνεται για την καλή διαχωριστική του ικανότητα. Σπανιότερα, χρησιμοποιείται το άζωτο. Το

φέρον αέριο ρέει πάντα στον ανιχνευτή επομένως είναι απαραίτητη η χρήση ενός αερίου με υψηλή καθαρότητα (99.995% ή υψηλότερη). Τα φερόμενα αέρια με υψηλή καθαρότητα μπορούν να καταστέλλουν τους «θορύβους» του υποβάθρου. Η επιλογή του φέροντος αερίου βασίζεται στον τύπο του χρησιμοποιούμενου ανιχνευτή. Επίσης η καταλληλότητα των φερόμενων αερίων κρίνεται βάσει ορισμένων προϋποθέσεων όπως (Shimadzu, 2020):

1. Το φέρον αέριο θα πρέπει να είναι αδρανές ώστε να επιτρέπεται η 'καθαρή' αλληλεπίδραση μεταξύ των συστατικών του δείγματος και του πληρωτικού υλικού της στήλης, προς αποφυγή τροποποίησης της ισορροπίας κατανομής μεταξύ των δύο φάσεων
2. Το φέρον αέριο δεν θα πρέπει να αντιδρά με το/α συστατικό/α του δείγματος προς ανάλυση, καθώς ούτε και με το πληρωτικό υλικό της στήλης διαχωρισμού
3. Το φέρον αέριο πρέπει να έχει σταθερές φυσικοχημικές ιδιότητες
4. Το φέρον αέριο δεν θα πρέπει να παρουσιάζει διαβρωτικές ή οξειδωτικές ιδιότητες τόσο κατά τη μεταφορά όσο και κατά την αποθήκευσή του
5. Το φέρον αέριο θα πρέπει να έχει χαμηλό ιξώδες, προσδίδοντας έτσι μεγαλύτερη διαχωριστική ικανότητα

Όταν αναπτύχθηκε αρχικά η αέρια χρωματογραφία, η κύρια λειτουργία που κατεύθυνε τη ροή εντός του συστήματος ήταν ο έλεγχος της πίεσης. Για λόγους ευκολίας, η αρχική πίεση (μερικές φορές γνωστή ως πίεση κεφαλής) ήταν σταθερή και όλες οι μετέπειτα μέθοδοι που δημιουργήθηκαν βασίζονταν στην λειτουργία σταθερής πίεσης. Ειδικότερα, καθώς το δείγμα «ρέει» από τη θέση έγχυσης προς τη θέση εξόδου, δέχεται λιγότερη ισχύ, και ως εκ τούτου επιβραδύνεται. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη διεύρυνση της κορυφής (peak broadening) καθώς αυξάνεται ο χρόνος κατακράτησης. Ένας τέτοιος αντίκτυπος είναι πιο σημαντικός στις τριχοειδείς στήλες, στις οποίες το μήκος της στήλης είναι πολύ μεγαλύτερο από ότι στις πεπληρωμένες στήλες. Με την πάροδο του χρόνου, οι μέθοδοι GC έχουν μετατοπιστεί σε περισσότερο βέλτιστες λειτουργίες, όπως η λειτουργία σταθερής ροής (cm^3 / s) και η λειτουργία σταθερής γραμμικής ταχύτητας (cm / s) (Bukhaiti et al., 2017).

Οι λειτουργίες σταθερής ροής και γραμμικής ταχύτητας ξεπέρασαν την αδυναμία της λειτουργίας σταθερής πίεσης, διορθώνοντας τον όγκο φερόμενου αερίου που διέρχεται από μία στήλη. Σε ιδανική περίπτωση, όταν ένας σωλήνας έχει μικρότερη διάμετρο, ο ίδιος όγκος καταλαμβάνει μεγαλύτερο μήκος. Για τον ίδιο όγκο, η ροή από τα σημεία 1 και 2 σε ένα δεδομένο χρονικό διάστημα, παρουσιάζει μεγαλύτερη ταχύτητα στο σημείο 2 (Εικόνα 6.7). Η διαδικασία είναι αναστρέψιμη. Εάν το υγρό ξεκινήσει να ρέει στην αντίθετη κατεύθυνση, η ταχύτητά του θα μειωθεί καθώς ο σωλήνας διευρύνεται. Αυτή η «ταχύτητα» είναι γνωστή ως γραμμική ταχύτητα. Σαν αποτέλεσμα, στην περίπτωση που χρησιμοποιείται η λειτουργία σταθερής ροής, η γραμμική ταχύτητα προοδευτικά επιβραδύνεται, επηρεάζοντας την αποτελεσματικότητα του διαχωρισμού (Shimadzu, 2020).



Εικόνα 6.7: Ροή υγρού μέσω στενότερης στήλης. Ο ίδιος όγκος υγρού καταλαμβάνει διαφορετικές περιοχές διατομής (A) σε σημεία 1 και 2, όπου το μέγεθος της στήλης είναι διαφορετικό. Αυτό προκαλεί διαφορετικό ρυθμό ροής και επομένως διαφορετική γραμμική ταχύτητα (velocity, v). Πηγή: Shimadzu, 2020

6.3.1.5 Ανιχνευτές

Μετά από τον διαχωρισμό των συστατικών του δείγματος μέσα στη στήλη, ακολουθεί η ανίχνευση και ο ποιοτικός / ποσοτικός προσδιορισμός τους. Υπάρχουν διάφοροι ανιχνευτές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην αέρια χρωματογραφία (Πίνακας 6.3). Εντελώς διαφορετικοί ανιχνευτές μπορούν να προσφέρουν διαφορετικές ιδιότητες (Bukhaiti et al., 2017).

Πίνακας 6.3: Τύποι ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται στην αέρια χρωματογραφία. Πηγή: Bukhaiti et al., 2017

Detector	Type	Support gases	Selectivity	Detectability	Dynamic range
Flame ionization (FID)	Mass flow	Hydrogen and air	Most organic cpds.	100 pg	10^7
Thermal conductivity (TCD)	Concentration	Reference	Universal	1 ng	10^7
Electron capture (ECD)	Concentration	Make-up	Halides, nitrates, nitriles, peroxides, anhydrides, organometallics	50 fg	10^5
Nitrogen- phosphorus	Mass flow	Hydrogen and air	Nitrogen, phosphorus	10 pg	10^6
Flame photometric (FPD)	Mass flow	Hydrogen and air possibly oxygen	Sulphur, phosphorus, tin, boron, arsenic, germanium, selenium, chromium	100 pg	10^3
Photo- ionization (PID)	Concentration	Make-up	Aliphatics, aromatics, ketones, esters, aldehydes, amines, heterocyclics, organosulphurs, some organometallics	2 pg	10^7

Οι εφαρμοζόμενοι ανιχνευτές για τον αναλυτικό προσδιορισμό των αρωματικών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων των PAHs, σε δείγματα χρησιμοποιώντας αέρια

χρωματογραφία περιλαμβάνουν τον ανιχνευτή φωτονιονισμού (PhotoIonization Detector, PID), τον ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (Flame Ionization Detector, FID), την φασματοσκοπία υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (Fourier Transform – Infrared, FT – IR) και το φασματόμετρο μάζας (Mass Spectrometer, MS) (Adeniji et al., 2017; Dong et al., 2012; Gorleku et al., 2014).

Ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας (Thermal Conductivity Detector, TCD)

Ο ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας αντιπροσωπεύει έναν από τους πρώτους ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν στην αέρια χρωματογραφία. Η λειτουργία του βασίζεται στη διαφοροποίηση της θερμικής αγωγιμότητας μεταξύ του δείγματος και του φερόμενου αερίου. Σε γενικές γραμμές, όπως προαναφέρθηκε, το He χρησιμοποιείται ως φέρον αέριο. Ωστόσο, το He παρουσιάζει υψηλή θερμική αγωγιμότητα. Άλλα αέρια περιλαμβάνουν το H₂, N₂ ή Ar. Όλες οι ενώσεις έχουν μία μοναδική σταθερά θερμικής αγωγιμότητας όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 6.4 και οι τιμές τους συνήθως είναι 6 με 10 φορές μεγαλύτερες από τις ενώσεις – στόχους. Όταν η θερμική αγωγιμότητα της ένωσης – στόχου είναι μεγαλύτερη από το φέρον αέριο, η κορυφή ανιχνεύεται με αρνητική τιμή. Ο TCD μπορεί να ανιχνεύσει τις περισσότερες ενώσεις εκτός από το φέρον αέριο αλλά η ευαισθησία του δεν είναι τόσο υψηλή σε σύγκριση με άλλους ανιχνευτές που θα συζητηθούν παρακάτω. Μεταξύ των άλλων ανιχνευτών της αέριας χρωματογραφίας, έχει σχεδόν την χαμηλότερη ευαισθησία. Η κύρια εφαρμογή του είναι η ανάλυση ενώσεων που δεν είναι ανιχνεύσιμες με FID, όπως το νερό, η φορμαλδεΰδη και το μυρμηκικό οξύ (Shimadzu, 2020).

Πίνακας 6.4: Ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας. Ενώσεις με σταθερή θερμική αγωγιμότητα. Πηγή: Shimadzu, 2020

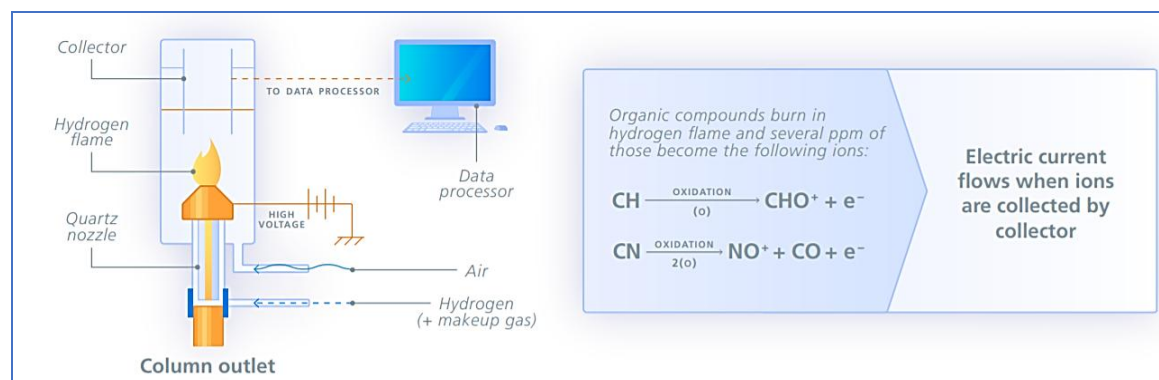
Compounds	Thermal Conductivity Constant (10 ⁻⁶ cal/s·cm·°C)
He	408
H ₂	547 (Very High)
N ₂	73
Ar	52
O ₂	76
H ₂ O	60
Ethane	77
Methanol	52
Acetone	40
Chloroform	24

Ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (Flame Ionization Detector, FID)

Ο FID είναι ένας σταθερός και πολύ ευαίσθητος ανιχνευτής που χρησιμοποιείται κυρίως για την ανάλυση οργανικών ενώσεων σε διάφορους τομείς (Εικόνα 6.8). Η

αρχή της λειτουργίας του βασίζεται στη μεταβολή της αγωγιμότητας λόγω του ιονισμού μίας οργανικής ένωσης κατά την καύση της σε φλόγα υδρογόνου – αέρα. Χρησιμοποιείται για σχεδόν όλες τις οργανικές ενώσεις, οι οποίες έχουν C – H ή C – N δομή. Εντούτοις, υπάρχουν πολλές εξαιρέσεις όπως το CO, CO₂ και το CS₂ που είναι μη – οργανικές ενώσεις που δεν μπορούν να ανιχνευθούν. Η καρβονυλική ομάδα και το C = O άτομο άνθρακα της καρβοξυλικής ομάδας επίσης δεν είναι ανιχνεύσιμα με αυτόν τον ανιχνευτή. Ο FID μπορεί να ανιχνεύσει τους περισσότερους υδρογονάνθρακες που έχουν δεσμό C – H στη δομή τους, εκτός από HCHO και HCOOH. Εντούτοις, το CHCOOH και η ακεταλδεΐδη (CH₃CHO), παρόλο που προέρχονται από την ίδια ομάδα ως HCHO και HCOOH, αντίστοιχα, έχουν έναν ακόμη άνθρακα και, ως εκ τούτου, είναι ανιχνεύσιμα λόγω του δεσμού C – H επιπρόσθετα του C = O (Shimadzu, 2020).

Παρόλο που ο FID είναι ένας ευαίσθητος ανιχνευτής για PAHs, η χρήση του περιορίζεται λόγω της ευαισθησίας τους στις παρεμβολές υποβάθρου από ορισμένους κοινούς περιβαλλοντικούς ρύπους όπως οι φθαλικοί εστέρες και άλλες συν – εκχυλισμένες μη – στοχευόμενες ενώσεις από ανθρακούχες πηγές. Επομένως, απαιτείται αρχικά καθαρισμός για την κατάλληλη ποσοτικοποίηση και ταυτοποίηση των αναλυτών που χρησιμοποιούν αυτόν τον ανιχνευτή (Adeniji et al., 2017; Buddhadasa, 2002; Cai et al., 2009).



Εικόνα 6.8: Ανιχνευτής ιονισμού φλόγας. Πηγή: Shimadzu, 2020

Φωτομετρικός ανιχνευτής φλόγας (Flame Photometric Detector, FPD)

Ο FPD είναι μία παραλλαγή του FID, ο οποίος είναι ένας ιδιαίτερα επιλεκτικός και ευαίσθητος ανιχνευτής, ειδικά για τον προσδιορισμό οργανοφωσφορικών ενώσεων. Ανιχνεύει φως μοναδικό για τα P, S και Sn με φλόγα υδρογόνου μέσω παρεμβολών φίλτρων (interference filter). Ο FPD είναι τόσο σταθερός και ευαίσθητος που είναι εύκολος στη χρήση. Χρησιμοποιείται κυρίως στην ανάλυση τροφίμων – για τον εντοπισμό φυτοφαρμάκων που περιέχουν φωσφόρο, οσμές θείου και food πρόσθετα τροφίμων – καθώς και στην περιβαλλοντική ανάλυση για την ανίχνευση οργανικών ενώσεων κασσίτερου στα θαλάσσια προϊόντα (Shimadzu, 2020).

Ανιχνευτής θερμοϊονισμού φλόγας (Flame Thermionic Detector, FTD)

Ο FTD είναι εξαιρετικά επιλεκτικός και ευαίσθητος ανιχνευτής οργανικών αζωτούχων ενώσεων, καθώς και ανόργανων και οργανικών ενώσεων φωσφόρου. Είναι επίσης γνωστός ως ανιχνευτής φωσφόρου – αζώτου (Nitrogen Phosphorus Detector, NPD) διότι μπορεί να ανιχνεύσει αζωτούχες ή / και φωσφορικές ενώσεις. Η αρχή και η βασική δομή είναι η ίδια με τον FPD. Καθώς, οι ανόργανες αζωτούχες ενώσεις δεν μπορούν να εντοπιστούν χρησιμοποιώντας FTD, ως εκ τούτου, δεν μπορεί να εφαρμοστεί για την ανάλυση αμμωνίου. Επίσης, η εκλεκτικότητά του σε φωσφορικές ενώσεις είναι χαμηλότερη σε σύγκριση με τον FPD. Οι κύριες εφαρμογές του FTD περιλαμβάνουν την ανάλυση φαρμάκων, αζωτούχων ή / και φωσφορικών φυτοφαρμάκων, μεταξύ άλλων (Shimadzu, 2020).

Ανιχνευτής φωτοϊονισμού (Photo – Ionization Detector, PID)

Ο PID είναι ένας άλλος τύπος αναλυτικού ανιχνευτή ατμού που ευρίσκεται υπό ανάπτυξη τα τελευταία 50 έτη. Είναι ευαίσθητος (πικογραμμάρια), μη – καταστροφικός και εφαρμόζεται σε ένα ευρύ φάσμα ενώσεων. Επιπλέον, έχει μεγάλο δυναμικό εύρος (έξι τάξεις μεγέθους). Ωστόσο, λόγω της καθυστερημένης απόκρισής του που προκύπτει από το μεγάλο θάλαμο ιονισμού και τον «νεκρό όγκο», η εφαρμογή τους σε συστήματα αέριας χρωματογραφίας είναι περιορισμένη. Ένα τυπικό εμπορικό PID έχει όγκο θαλάμου ιονισμού 40 – 200 μL με τον «νεκρό όγκο» να καλύπτει το 1/4 – 1/6 του θαλάμου. Ο χρόνος απόκρισης είναι της τάξης των μερικών δευτερολέπτων. Ωστόσο, δημιουργούνται οξείες κορυφές, οι οποίες δεν είναι επιθυμητές για ένα σύστημα αέριας χρωματογραφίας λόγω του περίπλοκου σχεδιασμού ή / και της σημαντικής μείωσης της ευαισθησίας (Zhu et al., 2015). Οι PID χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό πτητικών οργανικών ενώσεων και άλλων αερίων. Η κύρια χρήση τους είναι η παρακολούθηση της δυνητικής έκθεσης των εργαζομένων σε πτητικές οργανικές ενώσεις (Volatile Organic Compounds, VOCs), όπως διαλύτες, καύσιμα, απολιπαντικά, πλαστικά και πρόδρομοί τους, υγρά μεταφοράς θερμότητας, λιπαντικά, κ.λπ., κατά τη διάρκεια των διαδικασιών βιομηχανικής παραγωγής ή / και διαχείρισης αποβλήτων.

Φασματοσκοπία υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (Fourier Transform – Infrared, FT – IR)

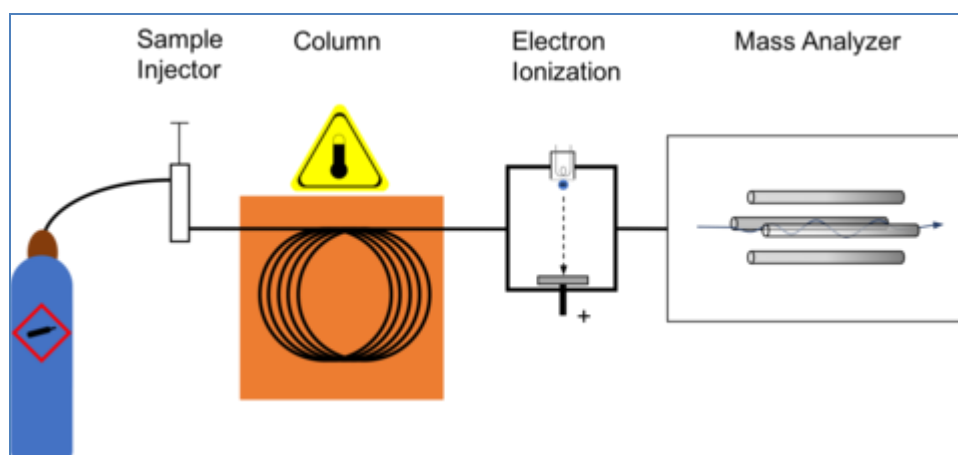
Η υπέρυθρη φασματοσκοπία είναι μία από τις πιο σημαντικές αναλυτικές τεχνικές που υπάρχουν, ικανές να αναλύσουν σχεδόν οποιοδήποτε δείγμα σε οποιαδήποτε κατάσταση. Η FT – IR είναι μία ενόργανη μέθοδος που βασίζεται στη μέτρηση της δόνησης ενός μορίου που διεγείρεται από υπέρυθρη ακτινοβολία σε ένα συγκεκριμένο εύρος μήκος κύματος (0.7 μm – 1000 μm). Είναι μία μη – καταστρεπτική μέθοδος, γρήγορη και απλή στη χρήση της, ακριβής, μηχανικά απλή και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ποσοτική και ποιοτική ανάλυση. Επιπρόσθετα, είναι φθηνή και δεν απαιτεί χρονοβόρα προ – επεξεργασία του δείγματος ή χρήση – επιβλαβών για το περιβάλλον – χημικών εκχυλισμάτων (Santos et al., 2019).

Φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometer, MS)

Η GC – MS είναι ανώτερη σε ικανότητα ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού, με πολύ βελτιωμένη απόδοση και λειτουργικότητα. Αποτελεί μία αναλυτική τεχνική που συνδυάζει τα χαρακτηριστικά της αέριας χρωματογραφίας και της φασματομετρίας μάζας, για τον διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση σύνθετων μιγμάτων χημικών ουσιών (Al – Fekaiki, 2014; Sparkman et al., 2011) (Εικόνα 6.9).

Η ανάλυση GC / MS περιλαμβάνει δύο μέρη· έναν αέριο χρωματογράφο, ο οποίος διαχωρίζει τα μίγματα χημικών σε επιμέρους συστατικά και έναν φασματόμετρο μάζας, το οποίο κατακερματίζει τις χημικές ουσίες σε μοναδικά πρότυπα / μοτίβα ή φάσματα (Al – Fekaiki, 2014).

Οι χρήσεις της GC / MS περιλαμβάνουν: (i) την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό πτητικών και ημι – πτητικών οργανικών ενώσεων σε σύνθετα μίγματα, (ii) τον προσδιορισμό των μοριακών βαρών – και μερικές φορές – της στοιχειακής σύστασης αγνώστων οργανικών ουσιών σε σύνθετα μίγματα και (iv) τον δομικό προσδιορισμό άγνωστων οργανικών ενώσεων σε σύνθετα μίγματα (Al – Fekaiki, 2014).



Εικόνα 6.9: Διάγραμμα GC / MS. Πηγή:

https://en.wikipedia.org/wiki/Gas_chromatography%E2%80%93mass_spectrometry

Η GC / MS σε επιλεγμένη λειτουργία παρακολούθησης ιόντων (Selected Ion Mode, SIM) και σε συνδυασμό με μια τριχοειδή στήλη είναι η πιο συχνά χρησιμοποιημένη τεχνική για τον αναλυτικό προσδιορισμό και ποσοτικοποίηση των PAHs, διότι προσδιορίζει τους αναλυτές ως προς το χρόνο κατακράτησης και το φάσμα μάζας, παρέχοντας δομικές πληροφορίες και υψηλή ευαισθησία που απαιτείται για την ποσοτικοποίηση σε λειτουργία SIM (Kumar et al., 2014; Nekhavhambe et al., 2014). Είναι πιο ακριβής από τις μη – επιλεκτικές διαδικασίες όπως η GC / FID και GC / PID και χρησιμοποιείται συχνά για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων πτητικών και μη – πτητικών συστατικών των PAHs (Adeniji et al., 2018). Ένα ευρύ φάσμα μη – πολικών ή ελαφρώς πολικών στατικών φάσεων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το

διαχωρισμό των PAHs, όπως για παράδειγμα η φαινυλ – υποκατεστημένη – μεθυλ – πολυσυλοξάνη (Khan et al., 2005).

Παράδειγμα, σε μία από τις συνθήκες GC / MS για την ποσοτική και την ποιοτική ανάλυση των PAHs: το δείγμα εγχύθηκε σε λειτουργία μη - διαμοιρασμού σε θερμοκρασία έγχυσης 300 ° C. Οι θερμοκρασίες γραμμής μεταφοράς και πηγής ιόντων ήταν 280 ° C και 200 ° C. Η θερμοκρασία της στήλης αρχικά διατηρήθηκε στους 40 ° C για 1 λεπτό, ανυψώθηκε στους 120 ° C με ρυθμό 25 ° C / λεπτό, στη συνέχεια στους 160 ° C με ρυθμό 10 ° C / min, και τέλος στους 300 ° C με τον ρυθμό 5 ° C / min, και διατηρήθηκε στην τελική θερμοκρασία για 15 λεπτά. Η θερμοκρασία του ανιχνευτή διατηρήθηκε στους 280 ° C. Το ήλιο χρησιμοποιήθηκε ως φορέας αερίων με σταθερό ρυθμό ροής 1 mL / min. Η φασματομετρία μάζας αποκτήθηκε χρησιμοποιώντας ιονισμό ηλεκτρονίων (Electron Ionization, EI) και επιλεκτική λειτουργία παρακολούθησης ιόντων (Cheng et al., 2012). Ο Πίνακας 6.5 παρουσιάζει μοριακή μάζα και τα ιόντα που επιλέχθηκαν για την παρακολούθηση των PAHs υπό καθορισμένες συνθήκες GC / MS (Mahgoub, 2016).

Πίνακας 6.5: Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, μοριακή μάζα και αντίστοιχα ιόντα. Πηγή: Mahgoub, 2016

Compound	Molecular mass	Ions
Naphthalene	128	128, 129, 127
Acenaphthylene	152	151, 152, 153
Acenaphthene	154	154, 153, 152
Fluorene	166	166, 165, 167
Phenanthrene	178	178, 179, 176
Anthracene	178	178, 167, 179
Fluoranthene	202	202, 203
Pyrene	202	202, 200, 203
Benzo(a)anthracene	228	228, 229
Chrysene	228	228, 226
Benzo(b)fluoranthene	252	252, 253
Benzo(k)fluoranthene	252	252, 253
Benzo(a)pyrene	252	252, 253
Indeno(1,2,3-cd)pyrene	276	276, 277
Dibenzo(a,h)anthracene	278	278, 279
Benzo(g,h,i)perylene	276	276, 277

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των PAHs, πρέπει να εφαρμόζονται τα ακόλουθα σημεία (Mahgoub, 2016):

6. Ο καθορισμός μίας καμπύλης βαθμονόμησης του παράγοντα σχετικής απόκρισης 5 – σημείων (Relative Response Factor, RRF) για τους αναλυτές

ενδιαφέροντος πριν από την ανάλυση και τον ποιοτικό έλεγχο των δειγμάτων. Ο RRF προσδιορίζεται για κάθε αναλυτή, για κάθε επίπεδο βαθμονόμησης χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση: $RRF = (A_a) (C_{is}) / (A_{is}) (C_a)$, όπου A_a = η περιοχή του αναλυτή που πρέπει να μετρηθεί, A_{is} = η περιοχή του συγκεκριμένου εσωτερικού προτύπου, C_a = η γνωστή συγκέντρωση του αναλυτή στο διάλυμα βαθμονόμησης ($\mu\text{g} / \text{ml}$) και C_{is} = η γνωστή συγκέντρωση του εσωτερικού προτύπου στο διάλυμα βαθμονόμησης ($\mu\text{g} / \text{mg}$)

7. Ο καθορισμός των συντελεστών απόκρισης για κάθε επίπεδο βαθμονόμησης προκειμένου να υπολογιστεί η μάζα (M_a) του κάθε αναλυτή – στόχου: $M_a = A_a M_{is} / A_{is} RRF$, όπου A_a = η περιοχή (εμβαδόν) του αναλυτή που μετρήθηκε, A_{is} = η περιοχή του συγκεκριμένου εσωτερικού προτύπου, M_{is} = η μάζα του εσωτερικού προτύπου που προστέθηκε στο εκχύλισμα και RRF = ο μέσος σχετικός συντελεστής απόκρισης για τον αναλυτή
8. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης (Concentration, C) κάθε αναλυτή – στόχου σε ένα δείγμα: $C = M_a D_f / W$, όπου D_f = ο συντελεστής αραίωσης που εφαρμόζεται στο εκχύλισμα και W = το βάρος του δείγματος

Στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 6.6**) παρουσιάζετε η βιβλιογραφική ανασκόπηση μεθόδων GC-MS με SPME σε υδατικά δείγματα.

Πίνακας 6.6: Βιβλιογραφική ανασκόπηση μεθόδων GC-MS με SPME σε υδατικά δείγματα.

Άρθρο	A sensitive GC/MS method using cold fiber SPME to determine polycyclic aromatic hydrocarbons in spring water	Measurement of Drinking Water Contaminants by Solid Phase Microextraction Initially Quantified in Source Water Samples by the USGS	Solid-phase microextraction–gas chromatographic–tandem mass spectrometric analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons Towards the European Union water directive 2006/0129 EC	Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking water at ppt levels by Solid Phase Micro Extraction Arrow coupled with GC-MS	Needle-Trap Device (NTD) Packed with Reduced Graphene Oxide (rGO) for Sample Preparation Prior to the Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) from Aqueous Samples by Gas Chromatography–Mass spectrometry (GC-MS)
Συγγραφείς	Helvécio C. et.al.	Stiles R. et.al.	Fernandez V. -Gonzalez et.al.	Manuela Bergna et.al.	Kamila Kędziora-Koch, et.al.
Έτος	2013	2008	2007	2000	2019
Μέθοδος	GC/MS, direct immersion and cooled fiber	A Varian CP-3800 gas chromatograph coupled to a Saturn 2200 GC/MS ion trap mass spectrometer (Walnut Creek, CA)	GC chromatograph equipped with a GC PAL auto-sampler (CTC-Analytics, Zwingen, Switzerland), split/splitless injector and coupled to an ion trap mass spectrometer (Polaris Q)	solid-phase microextraction (SPME) coupled with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)	Thermo Scientific Focus GC system equipped with a mass spectrometer detector (ISQ, Thermo Scientific) and a split/splitless injection port
Τύα	solid-phase microextraction (DI-CF-SPME)	70 µm Carbowax/divinylbenzene (CW/DVB) and 65 µm polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB), and the SPE columns (Supelclean ENVI-18, 6.0 mL, 1.0 g)	SPME fibers of 65 µm PDMS/DVB	100 µm PDMS SPME Arrow fiber (20 mm length, 3.8 µL volume)	Stainless steel needles (61mm 2.7mm I.D., 3.4mm O.D.) with the sealed conical tip and a side hole, connected to glass syringes
Ενώσεις	Naphthalene Acenaphthylene Acenaphthene Fluorene Phenanthrene, Anthracene, Fluoranthene Pyrene, Benzo[a]anthracene Chrysene Benzo[b]fluoranthene Benzo[k]fluoranthene	acetophenone, bis(2-ethylhexyl) adipate, chlorpyrifos, tetrachloroethene, butylated hydroxytoluene, diazinon, methyl parathion, N,N-diethyl-m-toluamide, naphthalene, anthracene, benzo(a)pyrene, bis(2-	QTM PAHs Mix acenaphthene, acenaphthylene, anthracene, benz[a]anthracene, benzo[a]pyrene, benzo[b]fluoranthene, benzo[ghi]perylene, chrysene, dibenz[a,h]anthracene, fluoranthene, fluorene, indeno[1,2,3-cd]pyrene,	naphthalene, acenaphthene, fluorene, anthracene, fluoranthene, pyrene, benzo[a]anthracene	anthracene (98.8%), fluoranthene (98%), pyrene (98%), benz(a)anthracene (99%), benzo(a)pyrene (96%)

	Benzo[a]pyrene, Indeno[1,2,3-cd]pyrene, Dibenzo[a,h]anthracene, Benzo[ghi]perylene	ethylhexyl) phthalate, carbaryl, diethyl phthalate, fluoranthene, 4-methylphenol, phenanthrene, phenol, pyrene, and triphenyl phosphate	naphthalene, phenanthrene, and pyrene; and 525 Fortification Solution {[2H10] acenaphthene (acenaphthene-d10), [2H12] chrysene (chrysene-d12), and [2H10] phenanthrene (phenanthrene-d10) at 2000 µg ml ⁻¹ each} and [2H8] naphthalene (naphthalene-d8) (2000 µg ml ⁻¹)		
Διαλυτικό μέσο	200 µg mL ⁻¹ in methanol: methylene chloride (1:1)		2000 µg ml ⁻¹ in methylene chloride		methanol
Στήλη	Thermo Scientific (West Palm Beach, FL, USA) capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm)	30 m 5% phenyl/95% dimethylsilicone fused silica DB-XLB capillary column with a 0.25 mm ID and 0.25 µm film thickness (JW Scientific, Folsom, CA)	DB-XLB column (60 m × 0.25 mm, 0.25 µm film thickness) (J&W Scientific, Folsom, CA, USA)	Thermo Scientific™ TG-5 SilMS 30 m × 0.25 mm I.D. × 0.25 µm film capillary column (P/N 26098-1420)	TRACE TR-5MS capillary column, 30m _ 0.25mm with a 0.25 mm film thickness
Χρόνος προγράμματος (min)	24min	55min	60min	30min	20 min
Επεξεργασία δειγμάτων	Φυγοκέντρηση πριν την ανάλυση, Ανάλυση εντός 48 ωρών	Ανάλυση εντός 48 ωρών	the samples were stirred at 500 rpm during the extraction with the SPME accessory of the Combi-PAL injector	then aged at room temperature more than 10 days before analysis	the sample solution (10 mL) was introduced into a glass vial, capped and placed in a water-thermostated bath
Δείγματα	Twenty-four springs in an urban area of Divinópolis, Minas Gerais, Brazil	Fifty-eight groundwater and treated water samples	water samples (tap, well, superficial, and seawater)	Πόσιμο	liquid samples (lake water sample)
Όριο Ανίχνευσης	7.10 to 57.96 ng L ⁻¹		0.23 to 5.54 ng L ⁻¹	0.5 to 3.0 ng L ⁻¹	0.09 to 0.26 mg L ⁻¹

6.3.1.6 Πρότυπες μέθοδοι αέριας χρωματογραφίας – PAHs

EPA 8021B

Η EPA 8021B είναι μία μέθοδος αέριας χρωματογραφίας που χρησιμοποιείται κυρίως σε συνδυασμό με PID για τον προσδιορισμό του επιπέδου ορισμένων πτητικών αρωματικών ενώσεων όπως το βενζόλιο, το τολουόλιο, το αιθυλβενζόλιο και τα ξυλόλια, καθώς και ορισμένων οξυγονικών αλάτων (π.χ. μεθυλ – τ – βουτυλαιθέρας [methyl – t – butyl ether, MTBE]), ενός αριθμού ολεφινών, κυκλοαλκανίων, διακλαδισμένων αλκανίων και ορισμένων αλογονωμένων ενώσεων σε διαφόρων τύπους δειγμάτων, συμπεριλαμβανομένων των υπόγειων υδάτων, υδατικών ιλύων, διαλυτών αποβλήτων, λιπαρών αποβλήτων, εδαφών και ιζημάτων. Έχει τα πλεονεκτήματα του ότι είναι επιλεκτική και ευαίσθητη, αν και ευκόλως απευαισθητοποιείται και επιμολύνεται από ενώσεις με υψηλά μοριακά βάρη (Adeniji et al., 2018).

EPA 610

Η EPA 610 σχεδιάστηκε ειδικά για τον προσδιορισμό των PAHs σε λύματα έπειτα από εκχύλιση υγρού – υγρού με μεθυλενοχλωρίδιο. Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι είναι διαθέσιμη για χρήση ως τεχνική υγρής χρωματογραφίας με ανίχνευση υπεριώδους ακτινοβολίας ή φθορισμού, καθώς επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως μέθοδος αέριας χρωματογραφίας είτε με πεπληρωμένη ή τριχοειδή στήλη σε συνδυασμό με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (GC/FID) (Cai et al., 2009).

EPA 8100

Η EPA 8100 είναι μία άλλη μέθοδος GC/FID που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό ενώσεων – στόχων σε δείγματα νερού ή εδάφους. Είναι μία μέθοδος αέριας χρωματογραφίας με πεπληρωμένη στήλη. Η μέθοδος επιτρέπει σε δείγματα νερού να ρυθμιστούν σε ουδέτερο pH και να εκχυλιστούν πριν από τον αναλυτικό προσδιορισμό χρησιμοποιώντας είτε LLE ή συνεχή LLE, ενώ η εκχύλιση στερεών δειγμάτων θα μπορούσε να επιτευχθεί μέσω της χρήσης Soxhlet ή υπερήχων. Εντούτοις, η πεπληρωμένη στήλη παρουσιάζει μία μεγάλη πρόκληση στην ανάλυση τεσσάρων ζευγών PAHs, που είναι το ανθρακένιο και το φαινανθρένιο, το χρυσένιο και το βενζο [a] ανθρακένιο, το βενζο [b] φλουορανθένιο και το βενζο [k] φθορανθένιο και τέλος το διβενζο [a,h] ανθρακένιο και το ινδενο [1,2,3 – cd] πυρένιο, αν και τα αναφερόμενα ζεύγη ενώσεων μπορούν να διαχωριστούν επαρκώς εάν χρησιμοποιηθεί τριχοειδής στήλη στη θέση της πεπληρωμένη στήλης. Διαφορετικά, επιβάλλεται ως απαραίτητο στάδιο ο καθαρισμός της πυριτικής πηκτής, εκτός εάν η μήτρα δείγματος είναι σχετικά καθαρή (Cai et al., 2009).

EPA 525 – 625 – 8270

Η EPA 525, 625 και 8270 είναι GC/MS μέθοδοι για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των PAHs και ορισμένων άλλων ρύπων σε διάφορα περιβαλλοντικά μέσα (Cai et al., 2009). Η EPA 525 σχεδιάστηκε για τον προσδιορισμό πολλών ομάδων ημι – πτητικών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων των PAHs, των φθαλικών και των PCBs στο πόσιμο νερό ή σε νερό ποταμών. Βασική συνθήκη είναι η ρύθμιση του pH του δείγματος νερού στο < 2 χρησιμοποιώντας 6N HCl πριν από την διαδικασία εκχύλισης στερεάς φάσης (Adeniji et al., 2018).

Η EPA 625, προορίζεται για την ανάλυση των αναφερόμενων κατηγοριών μολυσματικών ουσιών σε δείγματα λυμάτων. Τα δείγματα δημοτικών ή / και βιομηχανικών λυμάτων συνιστώνται για εκχύλιση σε δύο διαφορετικά pH, χρησιμοποιώντας LLE, ακολουθούμενη από ανάλυση GC / MS. Η ενημερωμένη έκδοση της μεθόδου (EPA 625.1) έχει συμπεριλάβει τη χρήση SPE ως εναλλακτική διαδικασία εκχύλισης (Adeniji et al., 2018).

Η EPA 8270 μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων ημι – πτητικών οργανικών ρύπων σε νερό, αέρα, εδάφη και άλλες μήτρες στερεών αποβλήτων. Παρομοίως, συνιστώνται τεχνικές προ – επεξεργασίας των δειγμάτων για υδατικά δείγματα, συμπεριλαμβανομένων των LLE και CLLE. Εκτός από τις αναφερόμενες μεθόδους εκχύλισης, η EPA 8270 μπορεί να προσδιορίσει ημι – πτητικές ενώσεις που απομονώνονται από εκπλύματα, τα οποία λαμβάνονται από τη διαδικασία έκπλυσης με χαρακτηριστική τοξικότητα (Toxicity Characteristic Leaching Procedure, TCLP) μέσω SPE. Ως εκ τούτου, εκτός από τους PAHs, η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί σε πολλές άλλες κατηγορίες οργανικών ενώσεων, όπως χλωριωμένους υδρογονάνθρακες, φυτοφάρμακα, αρωματικές νιτρο – ενώσεις, φαινόλες, νιτροζαμίνες, φθαλικούς εστέρες, οργανοφωσφορικούς εστέρες, αιθέρες, κετόνες, ανιλίνες, αλοαιθέρες, αλδεΐδες, πυριδίνες και κινολόνες (Adeniji et al., 2018).

EPA 8272

Η EPA 8272, μία άλλη τεχνική GC/MS χρησιμοποιείται για την ανάλυση δώδεκα PAHs (ναφθαλίνιο, ακεναφθυλένιο, ασεναφθένιο, φθόριο, φαινανθρένιο, ανθρακένιο, φθορανθένιο, πυρένιο, βενζ [a] ανθρακένιο, κρυζένιο, 2 – μεθυλναφθαλίνιο και 1 – μεθυλναφθαλίνιο) στο ενδοπορικό νερό που ανακτάται από ιζήματα, υπόγεια ύδατα και οποιοδήποτε άλλο δείγμα νερού (π.χ. θαλασσινό νερό, νερό βρύσης) (Cam et al., 2000; Qingling et al., 2006). Οι στοχευμένες ενώσεις που προσδιορίζονται με αυτή τη μέθοδο είναι εκείνες που είναι πολύ διαλυτές σε περιβαλλοντικά ύδατα. Το νερό συνήθως απομακρύνεται από το ιζήμα με φυγοκέντρηση, ακολουθούμενη από συλλογή του υπερκείμενου υγρού, ενώ άλλοι τύποι δειγμάτων παρασκευάζονται για ανάλυση με την απομάκρυνση κολλοειδούς μέσω κροκίδωσης χρησιμοποιώντας θειικό άλας καλίου – αργιλίου και υδροξείδιου του νατρίου. Το βήμα της κροκίδωσης επαναλαμβάνεται, ακολουθούμενο από φυγοκέντρηση, συλλογή υπερκείμενου και

μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase MicroExtraction, SPME). Στη συνέχεια, οι PAHs στο εκχύλισμα προσδιορίζονται με τη χρήση GC/MS με επιλεγμένη λειτουργία παρακολούθησης ιόντων (SIM) (Adeniji et al., 2018).

EPA 8410 – 8275

Η EPA 8410 και 8275 είναι δύο άλλες μέθοδοι που βασίζονται στην αέρια χρωματογραφία για την ανάλυση των PAHs. Η EPA 8410 χρησιμοποιεί FTIR για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων – στόχου σε ένα δείγμα εκχύλισης. Η μέθοδος θεωρείται πολύτιμο συμπλήρωμα της EPA 8270 καθώς επιτρέπει την κατάλληλη αναγνώριση ορισμένων ισομερών που συνήθως είναι δύσκολο να διαφοροποιηθούν χρησιμοποιώντας GC/MS. Η διαδικασία GC με τριχοειδή στήλη είναι εφαρμόσιμη για την ανάλυση πολλών ημι – πτητικών οργανικών ενώσεων σε λύματα, εδάφη, ιζήματα και στερεά απόβλητα. Ωστόσο, απαιτείται υποχρεωτικός καθαρισμός του εκχυλίσματος πριν από την έγχυση του δείγματος στον αέριο χρωματογράφο. Η EPA 8275 αντιπροσωπεύει μία άλλη μορφή GC/MS με τριχοειδή στήλη, που με την εφαρμογή θερμικής εκχύλισης, συμβάλλει στην ποσοτική ανάλυση συγκεκριμένων PCBs και των 16 PAHs της EPA σε εδάφη, ιλύες και στερεά απόβλητα (Cai et al., 2009).

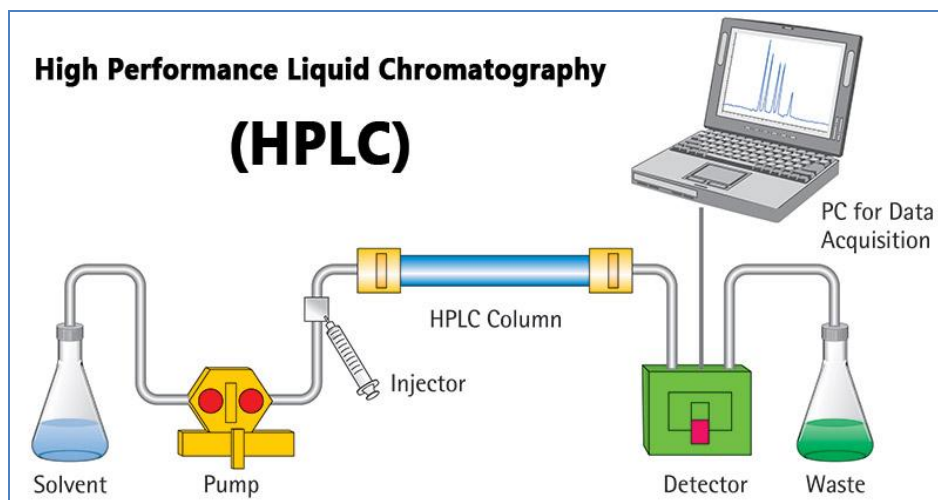
6.3.2 Μέθοδοι Υγρής Χρωματογραφίας

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής – απόδοσης (High – Performance Liquid Chromatography, HPLC) είναι μία τεχνική διαχωρισμού που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση οργανικών μορίων και ιόντων. Η HPLC βασίζεται σε μηχανισμούς προσρόφησης, κατανομής και ανταλλαγής ιόντων, ανάλογα με τον τύπο της στατικής φάσης που χρησιμοποιείται. Περιλαμβάνει μία συμπαγή στατική φάση, συνήθως συσκευασμένη σε μία στήλη από ανοξείδωτο χάλυβα, και μία υγρή κινητή φάση. Ο διαχωρισμός των συστατικών ενός διαλύματος προκύπτει από τη διαφορά στις σχετικές αναλογίες κατανομής των διαλυμάτων μεταξύ των δύο φάσεων. Η HPLC μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της καθαρότητας ή / και τον προσδιορισμό του περιεχόμενου πολλών ουσιών. Επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της εναντιομερικής σύνθεσης, χρησιμοποιώντας κατάλληλα τροποποιημένες κινητές φάσεις ή στατικές φάσεις χειρομορφικής χρωματογραφίας (The International Pharmacopoeia, 2019).

6.3.2.1 Οργανολογία

Ένα σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής – απόδοσης περιλαμβάνει ένα σύστημα άντλησης, ένα σύστημα εισαγωγής, μία χρωματογραφική στήλη, τη σταθερή και την κινητή φάση, τον ανιχνευτή και ένα σύστημα συλλογής και επεξεργασίας δεδομένων

(υπολογιστής, ολοκληρωτής ή καταγραφέας) (The International Pharmacopoeia, 2019) (Εικόνα 6.10).



Εικόνα 6.10: Οργανολογία υγρής χρωματογραφίας υψηλής – απόδοσης. Πηγή:

<https://microbenotes.com/high-performance-liquid-chromatography-hplc/>

Σύστημα άντλησης

Το σύστημα άντλησης απαιτείται για την παροχή μετρήσιμων ποσοτήτων της κινητής φάσης με σταθερό ρυθμό ροής. Ας σημειωθεί ότι το σύστημα σωληνώσεων και οι συνδέσεις πρέπει να είναι ικανά να αντέχουν στις πιέσεις που αναπτύσσονται από το σύστημα άντλησης. Επιπλέον, πολλές αντλίες HPLC είναι εξοπλισμένες με μία εγκατάσταση «εξαέρωσης» του συστήματος των παγιδευμένων φυσαλίδων αέρα. Τα συστήματα άντλησης που ελέγχονται από υπολογιστή ή μικρο – επεξεργαστή είναι ικανά να παρέχουν με ακρίβεια μία συγκεκριμένη ποσότητα κινητής φάσης είτε σε σταθερό ρυθμό (ισοκρατική έκλουση) ή σταδιακά (βαθμιδωτή έκλουση), σύμφωνα με ένα καθορισμένο πρόγραμμα. Ανάλογα με τον αριθμό των παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των διαστάσεων της στήλης, του μεγέθους των σωματιδίων της στατικής φάσης, του ρυθμού ροής και της σύνθεσης της κινητής φάσης, μπορούν να δημιουργηθούν πιέσεις έως 42.000 kPa (περίπου 6.000 psi) (The International Pharmacopoeia, 2019).

Εισαγωγέας

Το διάλυμα δείγματος εισάγεται συνήθως στην κινητή φάση που ρέει κοντά στην κεφαλή της στήλης, χρησιμοποιώντας ένα σύστημα έγχυσης, το οποίο βασίζεται σε σχεδιασμό βαλβίδας έγχυσης που μπορεί να λειτουργεί υπό υψηλή πίεση. Σε αυτή την

περίπτωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένας σταθερός βρόχος ή μία συσκευή μεταβλητού όγκου για την χειροκίνητη ή αυτόματη εισαγωγή του δείγματος (The International Pharmacopoeia, 2019).

Χρωματογραφική στήλη

Οι στήλες συνήθως κατασκευάζονται από ανοξείδωτο χάλυβα, έχουν μήκος 50 – 300 mm και εσωτερική διάμετρο 2 – 5 mm. Συνήθως, πληρώνονται με μία στατική φάση με μέγεθος σωματιδίων 3 – 10 µm. Οι στήλες με εσωτερική διάμετρο μικρότερη των 2 mm αναφέρονται συχνά ως «στήλες μικροβίων». Ιδανικά, η θερμοκρασία της κινητής φάσης και της στήλης πρέπει να διατηρείται σταθερή κατά τη διάρκεια της ανάλυσης. Οι περισσότεροι διαχωρισμοί πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, αλλά οι στήλες μπορεί να θερμαίνονται για επίτευξη καλύτερης απόδοσης (The International Pharmacopoeia, 2019).

Στατική φάση

Ο διαχωρισμός των ενώσεων με αυτή τη μέθοδο επιτυγχάνεται συνήθως με το διαχωρισμό των ενώσεων του δείγματος μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης. Τα συστήματα HPLC μπορεί να αποτελούνται από πολικές στατικές φάσεις και μη – πολικές κινητές φάσεις (υγρή χρωματογραφία κανονικής φάσης), καθώς και από μη – πολικές στατικές φάσεις και πολικές κινητές φάσεις (υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης). Υπάρχουν πολλοί τύποι στατικών φάσεων που χρησιμοποιούνται στην HPLC συμπεριλαμβανομένων (The International Pharmacopoeia, 2019):

1. Μη – τροποποιημένου πυριτίου, αλουμίνα ή πορώδη γραφίτη, όπου ο διαχωρισμός βασίζεται σε διαφορές προσρόφησης
2. Χημικώς τροποποιημένων πολυμερών, πυριτίου, πορώδη γραφίτη, όπου ο διαχωρισμός βασίζεται κυρίως στο διαχωρισμό των μορίων μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης
3. Ρητινών ή πολυμερών με οξικές ή βασικές ομάδες, που χρησιμοποιούνται στη χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων, όπου ο διαχωρισμός βασίζεται στον ανταγωνισμό των ιόντων που πρέπει να διαχωριστούν και εκείνων που ευρίσκονται στην κινητή φάση
4. Πορώδους διοξειδίου πυριτίου ή πολυμερών

Οι περισσότεροι μέθοδοι βασίζονται σε μηχανισμούς διαχωρισμού που χρησιμοποιούν χημικά – τροποποιημένο πυρίτιο ως στατική φάση και πολικούς διαλύτες ως κινητή φάση. Για αναλυτικούς διαχωρισμούς, το μέγεθος των σωματιδίων που χρησιμοποιούνται πιο συχνά ως στατική φάση, κυμαίνεται μεταξύ 3 µm και 10 µm. Το σχήμα των σωματιδίων μπορεί να είναι σφαιρικό ή ακανόνιστο, με διαφορετικό πορώδες και ειδική επιφάνεια (The International Pharmacopoeia, 2019).

Κινητή φάση

Η επιλογή της κινητής φάσης βασίζεται στην ικανότητα συγκράτησης, στις φυσικοχημικές ιδιότητες του αναλύτη, καθώς και στον τύπο του ανιχνευτή που χρησιμοποιείται. Συνήθως χρησιμοποιούνται μη – τροποποιημένες στατικές φάσεις λιπόφιλων διαλυτών ή υδαρείς κινητές φάσεις χωρίς οργανικούς τροποποιητές, ενώ η παρουσία νερού θα πρέπει να αποφεύγεται, καθώς μειώνει την αποτελεσματικότητα της στατικής φάσης. Η κινητή φάση πρέπει να φιλτράρεται μέσω κατάλληλων φίλτρων για την αφαίρεση σωματιδίων ή αδιάλυτου υλικού. Επίσης, οι διαλύτες θα πρέπει να απαεριώνονται μέσω ψεκασμού με ήλιο ή με υπερήχους πριν από την άντληση για την αποφυγή σχηματισμού φυσαλίδων αερίων στο σύστημα του ανιχνευτή. Ας σημειωθεί ότι, όταν χρησιμοποιείται φασματοφωτομετρικός ανιχνευτής, οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή της κινητής φάσης θα πρέπει να είναι διαφανείς στο μήκος κύματος της ανίχνευσης, ειδικά όταν η μέθοδος δοκιμής ορίζει χαμηλό φάσμα μήκους κύματος. Τέλος, κατά την προετοιμασία των κινητών φάσεων θα πρέπει να αποφεύγονται ρυθμιστικά διαλύματα υψηλής μοριακότητας (The International Pharmacopoeia, 2019).

Ανιχνευτές

Τα φασματοφωτόμετρα απορρόφησης υπεριώδους / ορατού (Ultraviolet / visible, UV / vis) χρησιμοποιούνται συνήθως για τον προσδιορισμό χημικών ουσιών με υγρή χρωματογραφία. Σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται περιπτώσεις φασματοφωτόμετρου φθορισμού, διαθλασίμετρων, ηλεκτροχημικών ανιχνευτών, εξατμιστικών ανιχνευτών σκέδασης του φωτός (Evaporative Light – Scattering Detectors, ELSD), φορτισμένων ανιχνευτών αερολύματος (Charged Aerosol Detectors, CAD), φασματομέτρου μάζας ή άλλων ειδικών ανιχνευτών (The International Pharmacopoeia, 2019).

Ένας από τους πολυτιμότερους ανιχνευτές στην υγρή χρωματογραφία είναι το φασματόμετρο μάζας, καθώς είναι πολύ χρήσιμο για την ταυτοποίηση και τον χαρακτηρισμό των πολικών συστατικών σε επίπεδο ιχνών, ιδιαίτερα εάν εμπλέκονται πολλές ενώσεις ενδιαφέροντος (Cheng et al., 2012). Έχει αναφερθεί μία ολοκληρωμένη χρήση της LC / MS για την ανάλυση αρωματικών ενώσεων, η οποία περιλαμβάνει τα εξής στάδια: (1) Εισαγωγή του δείγματος στο χρωματογράφο για διαχωρισμό, (2) Ροή μέσω μίας διεπαφής (όπως θερμοψεκασμός, ηλεκτροψεκασμός, κινούμενος ιμάντας και δέσμη σωματιδίων), όπου πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των ενώσεων – στόχων από την υδατική κινητή φάση, και (3) Εισαγωγή σε φασματόμετρο μάζας για χαρακτηρισμό (Hsu and Qiant, 1993). Ωστόσο, αξίζει να τονιστεί ότι δεν υπάρχει συγκεκριμένη διεπαφή, η οποία να είναι κατάλληλη για τον διαχωρισμό όλων των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων που ενυπάρχουν σε ένα δείγμα (Cai et al., 2009).

6.3.2.2 Πρότυπες μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας – PAHs

Στην περίπτωση των PAHs, οι μέθοδοι HPLC είναι ιδιαίτερα δημοφιλείς λόγω της ευκολίας προσδιορισμού θερμικά ασταθών ημι – πτητικών, λιγότερο πτητικών ή μη – πτητικών ενώσεων. Επιπρόσθετα είναι πιο ευαίσθητες, ειδικές και αναπαραγώγιμες σε σύγκριση με ορισμένες μεθόδους που βασίζονται στην αέρια χρωματογραφία (Emmenegger et al., 2003; Kumar et al., 2014).

EPA 550 – 610 – 8310

Οι μέθοδοι EPA 550, 610 και 8310 απαιτούν την επεξεργασία των υδάτινων δειγμάτων πριν από την ενόργανη ανάλυση μέσω διαδικασιών εκχύλισης υγρού – υγρού ή στερεάς φάσης για την απομόνωση των ενώσεων ενδιαφέροντος. Τα στερεά δείγματα εξάγονται χρησιμοποιώντας συσκευές Soxhlet ή υπερήχους με κατάλληλους διαλύτες. Τα εκχυλίσματα δείγματος πρέπει να διαλύονται σε οποιονδήποτε διαλύτη αναμίξιμο με αυτόν που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση πριν την έγχυση στο όργανο (Adeniji et al., 2018).

Αυτές οι μέθοδοι, συμπεριλαμβανομένης και της NIOSH 5506, καθορίζουν τους PAHs σε εκχυλίσματα χρησιμοποιώντας ανιχνευτές υπεριώδους ακτινοβολίας και φθορισμού, συνδεδεμένους σε σειρά. Εντούτοις, οι πρώτοι τέσσερις PAHs (ναφθαλένιο, ακεναφθυλένιο, ασεναφθένιο και φθόριο) στη λίστα προτεραιότητας της USEPA, δεν αναλύονται σε ικανοποιητικό βαθμό μέσω ανιχνευτών φθορισμού, και ως εκ τούτου, για την ανάλυσή τους χρησιμοποιείται ένας λιγότερο – ευαίσθητος ανιχνευτής υπεριώδους ακτινοβολίας, ενώ οι υπόλοιποι προσδιορίζονται χρησιμοποιώντας ανιχνευτή φθορισμού με καλύτερη ευαισθησία (Cai et al., 2009).

Η μέθοδος EPA 8310 παρέχει επαρκή ευαισθησία για την ανίχνευση PAHs σε δείγματα νερού. Η μέθοδος αυτή είναι επίσης εφαρμόσιμη για την ανάλυση PAHs σε δείγματα εκροών. Οι ανιχνευτές υπεριώδους ακτινοβολίας και φθορισμού χρησιμοποιούνται ευρύτερα στην υγρή χρωματογραφική μέτρηση των PAHs ειδικά εκείνων με υψηλό μοριακό βάρος. Ο ανιχνευτής UV/ορατής ακτινοβολίας μπορεί να ανιχνεύσει σχεδόν όλους τους PAHs στην περιοχή UV από 190 έως 360 nm. Η ευαισθησία και η επιλεκτικότητα του ανιχνευτή φθορισμού στον ποσοτικό προσδιορισμό των PAHs σε ένα σύνθετο περιβαλλοντικό μείγμα είναι πολύ υψηλότερη, ειδικά όταν απαιτείται η επιλογή κατάλληλων μηκών κύματος διέγερσης και εκπομπής (Cai et al., 2009; Filipkowska et al., 2005).

Τέλος, ο ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδιόδων (Photodiode Array, PDA) είναι πιο ευαίσθητος από τον ανιχνευτή UV/Ορατής ακτινοβολίας, και χρησιμοποιείται ορισμένες φορές ως εναλλακτική λύση, είτε μόνος τους (Kumar et al., 2014; Triantafyllaki and Dassenakis, 2005) ή σε συνδυασμό με ανιχνευτή φθορισμού (Ana et al., 2011). Παρόλα αυτά, ο τελευταίος παραμένει ο πιο ευαίσθητος μεταξύ των σύγχρονων ανιχνευτών LC, και συνιστάται ιδιαίτερα για τον προσδιορισμό PAHs σε επίπεδο ιχνών (Adeniji et al., 2018).

Πείραμα υγρής χρωματογραφίας για το διαχωρισμό των PAHs

Για τον σωστό διαχωρισμό των PAHs με HPLC, πρέπει να επιτυγχάνονται ελάχιστες απαιτήσεις και αυτές περιλαμβάνουν: δυαδική κλίση (gradient), κοιλάδα (valley) 50% για τη μέτρηση των συγκεντρώσεων με την κορυφή και απαεριοποίηση των διαλυτών για την ορθή λειτουργία της υψηλής – πίεσης αντλίας (Kahn et al., 2005). Παράδειγμα, σε μία από τις συνθήκες HPLC που έχουν εφαρμοστεί για την ποσοτική και ποιοτική ανάλυση των PAHs, για το διαχωρισμό των μεμονωμένων PAHs, παρασκευάστηκε ένα σύστημα HPLC αντίστροφης φάσης, όπου η στήλη (150 mm 5 μm HPLC) πληρώθηκε με C18 πηκτή πυριτίου. Η θερμοκρασία της στήλης κατά τη διάρκεια της ανάλυσης ήταν 30 ° C. Η έκλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας μια βαθμιδωτή τεχνική με τρεις διαλύτες: νερό – A, ακετονιτρίλιο – B και μεθανόλη – C (έναρξη 0 λεπτά - 20/20/60 Av / Bv / Cv; 20 λεπτά - 5/95/0 Av / Bv / Cv). Ο ρυθμός ροής ήταν 0,80 ml / min. Ο όγκος του βρόχου ήταν 10 μl. Ο ακόλουθος τύπος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης PAH (Tuteja et al., 2011):

$$\text{Concentration of PAHs in sample (}\mu\text{g mL}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Peak area of chromatogram of sample}}{\text{Peak area of chromatogram of standard PAHs compound}} \times \text{Conc. of stds. of PAHs compound}$$

Από όλες τις μεθόδους που συζητήθηκαν, οι πιο διαδεδομένες για τον προσδιορισμό των PAHs σε περιβαλλοντικά μέσα είναι οι GC/MS και οι HPLC με ανιχνευτές υπεριώδους ακτινοβολίας/φθορισμού. Η επιλογή βασίζεται στα κύρια πλεονεκτήματα της υψηλής ευαισθησίας και της επιλεκτικότητας, εκτός από την ικανότητα του φασματομέτρου μάζας να παρέχει πρόσθετες δομικές πληροφορίες όταν χρησιμοποιείται ως ανιχνευτής (Adeniji et al., 2018).

ΕΝΟΤΗΤΑ 7: ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

Οι αναλυτικές μέθοδοι πρέπει να αξιολογηθούν και να δοκιμαστούν ώστε να βεβαιωθεί ότι παράγουν έγκυρα αποτελέσματα κατάλληλα για τον επιδιωκόμενο σκοπό, δηλαδή πρέπει να επικυρωθούν. Η επικύρωση ή / και η επαλήθευση μίας μεθόδου ακολουθεί ένα τυποποιημένο σύνολο πειραματικών δοκιμών που παράγουν δεδομένα σχετιζόμενα με διάφορες παραμέτρους. Το κεντρικό ζήτημα που πρέπει να αντιμετωπιστεί πριν από την ανάπτυξη μίας νέας μεθόδου είναι η καθιέρωση του σκοπού για τον οποίο θα χρησιμοποιηθούν τα αποτελέσματα. Αυτό θα καθορίσει τα κριτήρια αποδοχής για την εκτέλεση της μεθόδου και μπορεί να καθορίσει ή να περιορίσει την επιλογή των τεχνικών (UNODC, 2009).

7.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ

Στη βιβλιογραφία, υπάρχουν χρήσιμα πρωτόκολλα και νομοθετικές υπηρεσίες για την επικύρωση της μεθόδου, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται αυτών της Ορθής Παρασκευαστικής Πρακτικής (Good Manufacturing Practice), του Κώδικα Ομοσπονδιακών Κανονισμών (Code of Federal Regulations), του Οργανισμού Ελέγχου Φαρμάκων και Τροφίμων (Food and Drug Administration), της Διεθνούς Σύμβασης για την Εναρμόνιση (International Conference on Harmonization) και της Ευρωπαϊκής Επιτροπής (2002/657/EK). Οι μέθοδοι μπορούν να ταξινομηθούν με διάφορους τρόπους, όπως για παράδειγμα σε ποσοτικές και ποιοτικές μεθόδους. Ειδικότερα, τόσο οι ποιοτικές όσο και οι ποσοτικές μέθοδοι απαιτούν τον καθορισμό ενός συνόλου παραμέτρων επικύρωσης που θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται σε ένα πρωτόκολλο. Αυτές περιλαμβάνουν: την ειδικότητα / επιλεκτικότητα, το όριο ανίχνευσης (ανιχνευσιμότητα), την επαναληψιμότητα / αναπαραγωγιμότητα, την σταθερότητα, την γραμμικότητα / εύρος εργασίας, την ακρίβεια / πιστότητα (bias), την ανάκτηση και την αβεβαιότητα μέτρησης (UNODC, 2009).

7.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΠΑΛΗΘΕΥΣΗΣ

Όταν ένα εργαστήριο εφαρμόζει μία μέθοδο που έχει ήδη επικυρωθεί, δεν υπάρχει ανάγκη επανεπικύρωσης της μεθόδου, αλλά η απόδοσή της πρέπει να επαληθεύεται για το ελάχιστο σύνολο παραμέτρων (ειδικότητα / επιλεκτικότητα, όριο ανίχνευσης, και επαναληψιμότητα ή αναπαραγωγιμότητα και ακρίβεια bias). Συνήθως, η επαλήθευση περιλαμβάνει τον προσδιορισμό λιγότερων παραμέτρων και την πραγματοποίηση λιγότερων μετρήσεων για κάθε παράμετρο σε σύγκριση με την επικύρωση. Τα αποτελέσματα της επαλήθευσης ενδέχεται να διαφέρουν ελαφρώς από αυτά που έχουν ληφθεί κατά τη διάρκεια της επικύρωσης, εντούτοις, ο σκοπός για τον οποίο θα χρησιμοποιηθεί η μέθοδος, καθορίζει εάν είναι αποδεκτά ή μη – αποδεκτά (UNODC, 2009).

7.3 ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ / ΕΠΑΛΗΘΕΥΣΗΣ

7.3.1 Ειδικότητα / επιλεκτικότητα (specificity / selectivity)

Αυτή η παράμετρος σχετίζεται με τον βαθμό κατά τον οποίο άλλες ουσίες παρεμβαίνουν στον προσδιορισμό, κατά περίπτωση, στην ποσοτικοποίηση της αναλυόμενης ουσίας – στόχου. Αποτελεί ένα μέτρο της ικανότητας της μεθόδου να αναγνωρίζει / ποσοτικοποιεί τους αναλυτές παρουσία άλλων ουσιών, ενδογενών ή εξωγενών, σε μία μήτρα δείγματος. Η ειδικότητα προσδιορίζεται με την προσθήκη υλικών που μπορούν να ευρισκονται στα δείγματα. Η ειδικότητα εξαρτάται από την συγκέντρωση και πρέπει να προσδιορίζεται στο χαμηλότερο όριο του εύρους βαθμονόμησης. Η επικύρωση πρέπει να πληροί τον σκοπό της μεθόδου και να

διασφαλίζει τη γνώση των επιπτώσεων των προσμίξεων, ουσιών διασταυρούμενης αντίδρασης κ.λπ., που μπορεί να συνυπάρχουν στη μήτρα (UNODC, 2009).

7.3.2 Όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD)

Το όριο ανίχνευσης αποτελεί την χαμηλότερη συγκέντρωση του αναλυτή που μπορεί να ανιχνευθεί και να ταυτοποιηθεί με ένα δεδομένο βαθμό βεβαιότητας. Το LOD ορίζεται επίσης ως η χαμηλότερη συγκέντρωση που μπορεί να διακριθεί από το θόρυβο ή το υπόβαθρο με κάποιο βαθμό εμπιστοσύνης. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για την εκτίμηση του LOD, όλες εξαρτώνται από την ανάλυση των τυφλών δειγμάτων και την εξέταση του λόγου σήματος / θόρυβος. Η ελάχιστη απαίτηση της τιμής της εν λόγω αναλογίας που είναι ευρέως αποδεκτή είναι 3. Εντούτοις, το LOD δεν είναι ισχυρή και αξιόπιστη παράμετρος και μπορεί να επηρεαστεί από μικρές αλλαγές στο αναλυτικό σύστημα (π.χ. θερμοκρασία, καθαρότητα αντιδραστηρίων, επιδράσεις μήτρας, ενόργανες συνθήκες). Επομένως, είναι σημαντικό αυτή η παράμετρος να επαληθεύεται πάντα από εργαστήρια που υιοθετούν προηγουμένως επικυρωμένες μεθόδους (UNODC, 2009).

7.3.3 Επαναληψιμότητα / αναπαραγωγιμότητα (precision)

Η επαναληψιμότητα είναι ένα μέτρο της εγγύτητας των αναλυτικών αποτελεσμάτων που λαμβάνονται από μία σειρά επαναλαμβανόμενων μετρήσεων της ίδιας μέτρησης υπό τις ίδιες συνθήκες. Αντικατοπτρίζει τα τυχαία σφάλματα που εμφανίζονται σε μία μέθοδο. Δύο κοινά αποδεκτές ομάδες συνθηκών υπό τις οποίες υπολογίζεται η επαναληψιμότητα είναι οι επαναλαμβανόμενες και οι αναπαραγωγίμες συνθήκες. Οι συνθήκες επαναληψιμότητας συμβαίνουν όταν ο ίδιος αναλυτής αναλύει δείγματα την ίδια ημέρα με το ίδιο όργανο (π.χ. αέριος χρωματογράφος) ή υλικά στο ίδιο εργαστήριο. Οποιαδήποτε διακύμανση από αυτές τις συνθήκες (π.χ. διαφορετικοί αναλυτές, διαφορετικές ημέρες, διαφορετικά όργανα, διαφορετικά εργαστήρια) αντιπροσωπεύουν τις συνθήκες αναπαραγωγιμότητας. Η επαναληψιμότητα υπολογίζεται συνήθως ως συντελεστής διακύμανσης ή σχετική τυπική απόκλιση των αναλυτικών αποτελεσμάτων που λαμβάνεται από ανεξάρτητα πρότυπα ποιοτικού ελέγχου και εξαρτάται από την συγκέντρωση. Ως εκ τούτου, πρέπει να υπολογίζεται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις εντός του εύρους εργασίας (UNODC, 2009).

7.3.4 Γραμμικότητα και εύρος εργασίας (linearity and working range)

Παραδοσιακά, οι μέθοδοι περιγράφονται ως γραμμικές όταν υπάρχει άμεσα αναλογική σχέση μεταξύ της απόκρισης της μεθόδου και της συγκέντρωσης του αναλυτή στη μήτρα, πάνω από το εύρος των συγκεντρώσεων του αναλυτή – στόχου (εύρος εργασίας). Το εύρος εργασίας καθορίζεται από τον σκοπό της μεθόδου και μπορεί να αντικατοπτρίζει μόνο ένα μέρος του πλήρους γραμμικού εύρους. Τα

κριτήρια αποδοχής περιλαμβάνουν συνήθως μία Goodness of Fit δοκιμή. Ένας υψηλός συντελεστής συσχέτισης (r) 0.99 χρησιμοποιείται συχνά ως κριτήριο γραμμικότητας (UNODC, 2009).

7.3.5 Ακρίβεια (accuracy, bias)

Η ακρίβεια αποτελεί ένα μέτρο της διαφοράς μεταξύ των προσδοκώμενων αποτελεσμάτων της δοκιμής και της αποδεκτής τιμής αναφοράς, που προκύπτει λόγω της συστηματικής μεθόδου και των εργαστηριακών σφαλμάτων. Συνήθως εκφράζεται ως ποσοστό. Η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα καθορίζουν από κοινού το συνολικό σφάλμα της ανάλυσης. Η ακρίβεια προσδιορίζεται ιδανικά χρησιμοποιώντας πιστοποιημένα υλικά αναφοράς (Certified Reference Materials, CRMs), εάν υπάρχουν, μεθόδους αναφοράς, συνεργατικές μελέτες ή άλλες συγκριτικές μεθόδους. Είναι σύνηθες να εκτιμάται η ακρίβεια αναλύοντας δείγματα σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (χαμηλή, μεσαία, υψηλή) που καλύπτουν το εύρος εργασίας. Οι συγκεντρώσεις αυτών των προτύπων θα πρέπει να είναι διαφορετικές από αυτές που χρησιμοποιούνται για την προετοιμασία των καμπυλών βαθμονόμησης και πρέπει να προετοιμάζονται από διαφορετικό πρότυπο διάλυμα. Τα κριτήρια ακρίβειας αντικατοπτρίζουν εκείνα της επαναληψιμότητας (UNODC, 2009).

7.3.6 Ανάκτηση (recovery)

Σε έναν προσδιορισμό, η ανάκτηση ενός αναλυτή αντιπροσωπεύει την απόκριση του ανιχνευτή σε μία δεδομένη ποσότητα αναλυτή που προστέθηκε και εξήχθη από τη μήτρα, σε σύγκριση με την απόκριση του ανιχνευτή για μία πραγματική συγκέντρωση καθαρού προτύπου. Πειράματα ανάκτησης πρέπει να πραγματοποιούνται με τη σύγκριση των αναλυτικών αποτελεσμάτων για τα εξαγόμενα δείγματα σε τρεις συγκεντρώσεις (συνήθως αυτές που αντιστοιχούν σε δείγματα – ελέγχου που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της ακρίβειας και της επαναληψιμότητας μίας μεθόδου). Η ανάκτηση του αναλυτή δεν χρειάζεται να είναι 100%, αλλά η έκταση της ανάκτησης – του αναλυτή και του εσωτερικού προτύπου – πρέπει να είναι συνεπής (για όλες τις ελεγχόμενες συγκεντρώσεις), ακριβής και αναπαραγώγιμη ($> 20\%$) (UNODC, 2009).

7.3.7 Αβεβαιότητα μέτρησης (uncertainty)

Ο έλεγχος της αβεβαιότητας παρέχει διασφάλιση της καταλληλότητας των αποτελεσμάτων και των συμπερασμάτων των μεθόδων και των αναλυτικών σχημάτων όσον αφορά το σκοπό. Μετρολογικά, η αβεβαιότητα ορίζεται ως παράμετρος που σχετίζεται με το αποτέλεσμα της μέτρησης που χαρακτηρίζει τη διασπορά των τιμών που θα μπορούσε να αποδοθεί στο measurand (ειδική ποσότητα που υπόκειται σε μέτρηση). Σε πιο πρακτικούς όρους, η αβεβαιότητα μπορεί να

οριστεί ως πιθανότητα ή επίπεδο εμπιστοσύνης. Συνήθως χρησιμοποιείται διάστημα εμπιστοσύνης 95%. Η κατανόηση της αβεβαιότητας είναι θεμελιώδης για την ερμηνεία και την αναφορά των αποτελεσμάτων. Περιλαμβάνει πολλά στοιχεία και υπολογίζεται με την εκτίμηση των σφαλμάτων που σχετίζεται με τα διάφορα στάδια της ανάλυσης (UNODC, 2009).

7.3.8 Σταθερότητα (stability)

Η επικύρωση της μεθόδου πρέπει να αποδεικνύει το βαθμό στον οποίο οι αναλυτές είναι σταθεροί καθ' όλη τη διάρκεια της αναλυτικής διαδικασίας, συμπεριλαμβανομένης της αποθήκευσης πριν και μετά το πέρας της ανάλυσης. Σε γενικές γραμμές, πραγματοποιείται συγκρίνοντας προσφάτως παρασκευασμένα πρότυπα γνωστής συγκέντρωσης με παρόμοια πρότυπα που διατηρούνται για διαφορετικές χρονικές περιόδους και διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης (UNODC, 2009).

7.4 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ / ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΕΠΑΛΗΘΕΥΣΗΣ ΟΡΓΑΝΩΝ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΥ

Η απόδοση των εργαστηριακών οργάνων και εξοπλισμού μπορεί να αλλάξει με την πάροδο του χρόνου, είτε βραχυπρόθεσμα, λόγω διακυμάνσεων στο περιβάλλον, ή μακροπρόθεσμα λόγω της εκτεταμένης χρήσης των μηχανικών, οπτικών ή ηλεκτρονικών εξαρτημάτων. Αυτές οι αλλαγές μπορεί να μην είναι προφανείς και μπορεί να οδηγήσουν σε σφάλματα. Ως εκ τούτου, για την αποφυγή των δυνητικών σφαλμάτων πρέπει τα όργανα και ο εξοπλισμός να ελέγχονται πραγματοποιώντας τακτικές προληπτικές διαδικασίες συντήρησης και βαθμονόμησης. Ο τρόπος παρακολούθησης της απόδοσης των οργάνων και του εξοπλισμού (επαλήθευσης απόδοσης ή πιστοποίηση απόδοσης) και η συχνότητα των ελέγχων βαθμονόμησης (διάστημα βαθμονόμησης) θα πρέπει να ορίζονται από Πρότυπες Διαδικασίες Λειτουργίας (Standard Operating Procedures, SOPs) (UNODC, 2009).

7.4.1 Αέριος χρωματογράφος

Οι χρησιμοποιούμενες εργασίες συντήρησης – ρουτίνας περιλαμβάνουν τον έλεγχο του διαφράγματος, της επένδυσης του συστήματος έγχυσης, των πιέσεων των αερίων, των φίλτρων εισόδου, των επιπέδων σήματος αναλυτή, θορύβου και υποβάθρου. Ανάλογα με τον βαθμό χρήση του οργάνου, είναι λογικό να υπάρχει ένα πρόγραμμα συντήρησης – ρουτίνας που να περιλαμβάνει εβδομαδιαία αλλαγή του διαφράγματος και της επένδυσης του συστήματος έγχυσης (UNODC, 2009).

- *Παράμετρος προς βαθμονόμηση: θερμοκρασία κλιβάνου*
 - Μέθοδος: έλεγχος με φορητό πυρόμετρο ή θερμόμετρο ακριβείας που πρέπει να τοποθετηθεί όσο το δυνατόν πιο κοντά στον αισθητήρα
 - Διάστημα βαθμονόμησης: ετησίως
- *Παράμετρος προς επαλήθευση: απόδοση στήλης*
 - Μέθοδος: ανάλυση ενός συνόλου χρησιμοποιούμενων προτύπων
 - Διάστημα επαλήθευσης: μηνιαίως
- *Παράμετρος προς επαλήθευση: ευαισθησία ανιχνευτή, σήμα αναλυτή, θορύβου και υποβάθρου*
 - Μέθοδος: ανάλυση και σύγκριση ενός συνόλου τυποποιημένων προτύπων
 - Διάστημα επαλήθευσης: μηνιαίως
- *Παράμετρος προς βαθμονόμηση: ρυθμοί ροής αερίων – ανιχνευτών*
 - Μέθοδος: χρησιμοποίηση μετρητή ροής φουσαλίδων ή βαθμονομημένο ηλεκτρονικό μετρητή ροής (σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή)
 - Διάστημα βαθμονόμησης: όταν ο ανιχνευτής καθαρίζεται ή συντηρείται ή όταν η αναλυτική στήλη αλλάζει ή όταν η απόδοση μειώνεται

ΕΝΟΤΗΤΑ 8: ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ

8.1: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Για την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων, χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά:

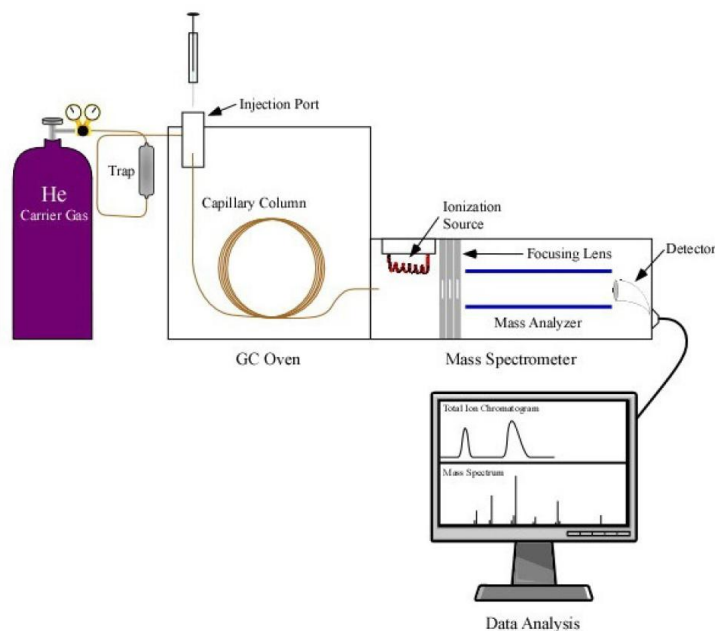
- Φιαλίδια χωρητικότητας 15ml (15ml Clear Vial, Screw Top, Hole Cap PTFE/Silicone Septa)
- Φιαλίδια χωρητικότητας 20ml (CI R-Bottomed 18mm Screw Top Headspace Vial 23×75mm)
- Φιαλίδια Supelco χωρητικότητας 4ml (4ml Clear Scraw Top Vial)
- Πιπέτα BIOHIT χωρητικότητας 100-1000μl
- Μικροσύριγγες 100 μL και 500 μL (Thermoscientific, Syringe SGE 10uL AGO 50mm needle)
- Πρότυπο μίγμα 17 πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων όγκου 1 mL της Agilent (acenaphthene, acenaphthylene, anthracene, benzo[b]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, benzo[ghi]perylene, benzo[a]pyrene, chrysene, dibenz[a,h]anthracene, fluoranthene, fluorene, indeno[1,2,3-cd]pyrene, naphthalene, phenanthrene, pyrene, benz[a]anthracene)
- Πρότυπο μίγμα Βενζολίου όγκου 1 mL της Agilent
- Διαλύτης Εξάνιο Sigma Aldrich Chromasolv for GC $\geq 99.9\%$
- Αναλυτικός ζυγός (SHIMADZU UniBlock AUW120D, S/N: D449911638).
- Υπερκάθαρο νερό BIOSEP
- Vortex
- Parafilm Roll

Για την απομόνωση των αναλυτών από τα υδατικά δείγματα, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική SPME με τα εξής υλικά:

- Ίνα Supelco SPME Fiber Assembly 100um PDMS, Fused Silica 24Ga, Manual Holder, 3pk (Red)
- Υδραργυρικό θερμόμετρο
- Θερμαντική πλάκα – μαγνητικός αναδευτήρας (VELP SCIENTIFICA ARE Heating Magnetic Stirrer, S/N:82102)
- Φιαλίδια χωρητικότητας 20ml (CI R-Bottomed 18mm Screw Top Headspace Vial 23×75mm)
- Αυτόματη πιπέτα (BIOHIT Proline 100-1000μL, Lot No.6123453)

8.2:Οργανολογία GC-MS

Για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των PAHs σε υδατικά δείγματα χρησιμοποιήθηκε το όργανο αέριας χρωματογραφίας με φασματομετρία μάζας (GC-MS) (Εικόνα 1). Το GC-MS αποτελείται από δύο κύρια δομικά στοιχεία: τον αεριοχρωματογράφο και το φασματόμετρο μάζας. Ο αεριοχρωματογράφος χρησιμοποιεί μια τριχοειδή στήλη της οποίας οι ιδιότητες σχετικά με τον διαχωρισμό μορίων εξαρτώνται από τις διαστάσεις της στήλης (μήκος, διάμετρος, πάχος υμενίου) καθώς και από τις ιδιότητες φάσης (π.χ. 5% φαινυλ πολυσιλοξάνη). Η διαφορά στις χημικές ιδιότητες μεταξύ διαφορετικών μορίων σε ένα μείγμα και η σχετική τους συγγένεια για τη στατική φάση της στήλης θα προάγει το διαχωρισμό των μορίων καθώς το δείγμα κινείται στο μήκος της στήλης. Τα μόρια συγκρατούνται από τη στήλη και στη συνέχεια εκκλύονται από τη στήλη σε διαφορετικούς χρόνους (που ονομάζεται χρόνος συγκράτησης), και αυτό επιτρέπει στο φασματόμετρο μάζας προς τα κάτω να συλλάβει, να ιονίσει, να επιταχύνει, να εκτρέψει και να ανιχνεύσει τα ιονισμένα μόρια ξεχωριστά. Το φασματόμετρο μάζας το κάνει αυτό σπάζοντας κάθε μόριο σε ιονισμένα θραύσματα και ανιχνεύοντας αυτά τα θραύσματα χρησιμοποιώντας την αναλογία μάζας προς φόρτιση.



Εικόνα 8.1:Οργανολογία GC-MS (Shubin Wu et al. 2012)

Πιο συγκεκριμένα για την ενόργανη ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το όργανο αέριας χρωματογραφίας με φασματομετρία μάζας (GC –MS Finnigan Trace GC Ultra – Polaris Quadrupole Ion Trap) (Εικόνα 2) προσαρμόζοντάς το στις κατάλληλες συνθήκες μέσω του λογισμικού Xcalibur της Thermo Electron Corporation.

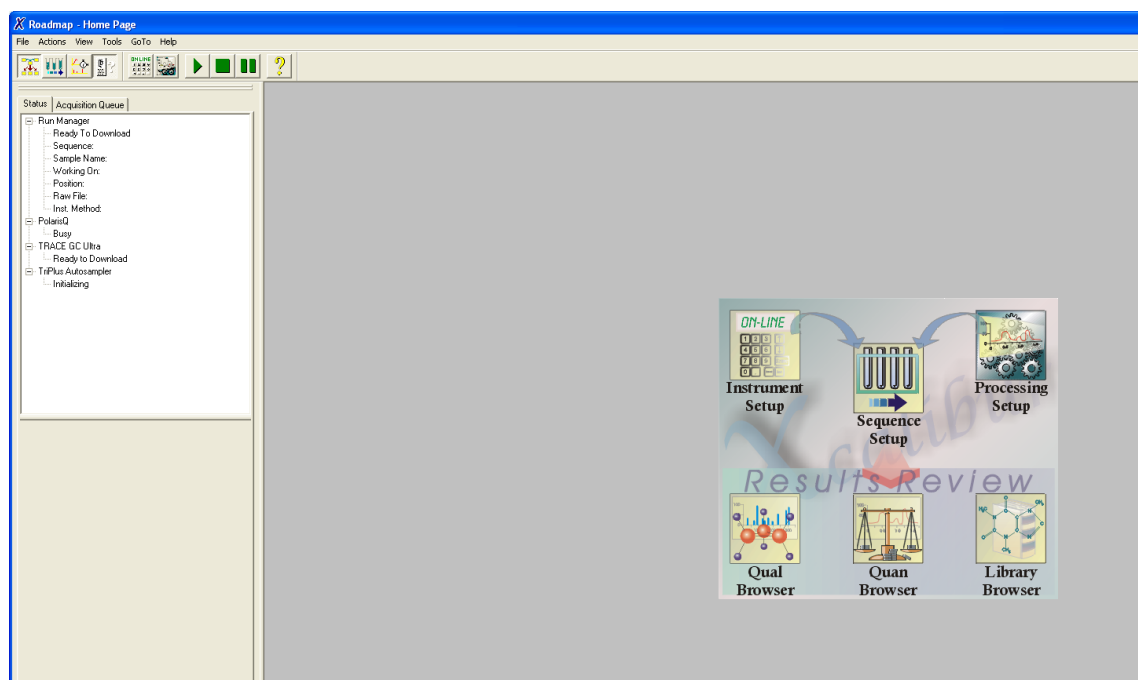


Εικόνα 8.2: Σύστημα A Finnigan Trace GC Ultra/Polaris Quadrupole Ion Trap GC/ MS system.

8.3: Επιλογή παραμέτρων GC/ MS

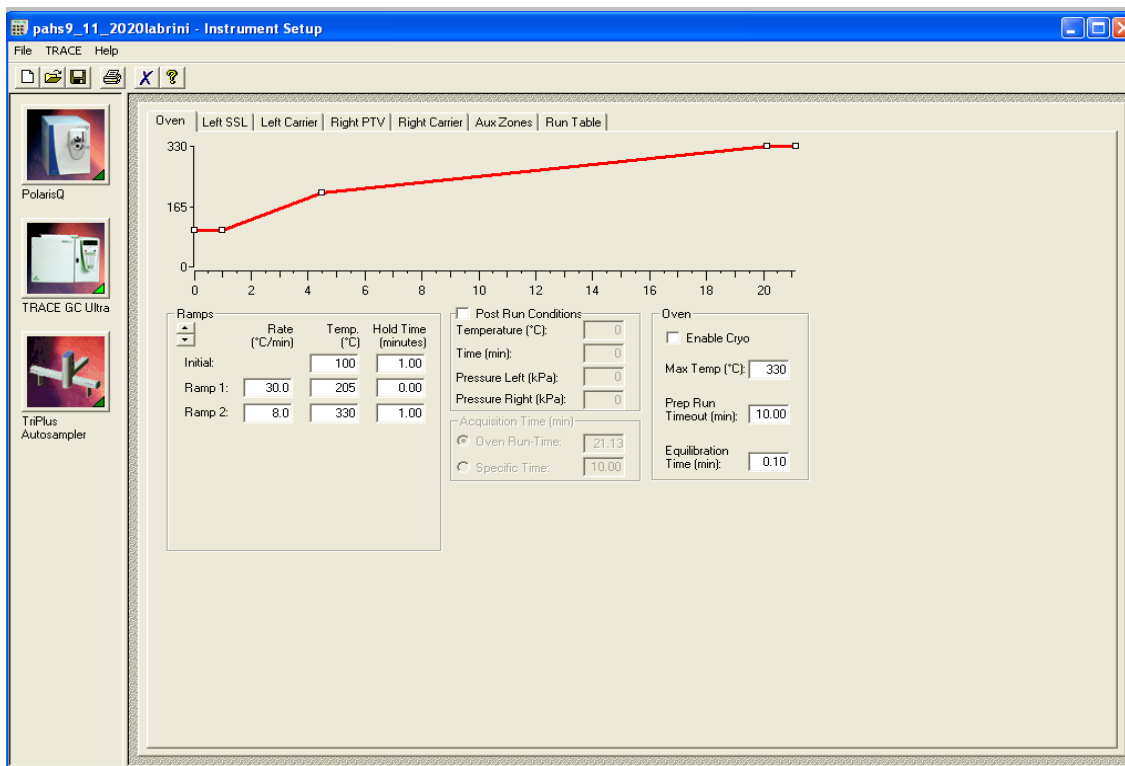
Η ανάλυση των δειγμάτων γίνεται με την εισαγωγή του δείγματος στο χρωματογράφο. Έχοντας ρυθμίσει κατάλληλα την θερμοκρασία της θύρας του χρωματογράφου, η ίνα εκτίθεται. Η θερμοκρασία της θύρας καθώς και τα βήματα της ανάλυσης έχουν προηγουμένως προγραμματιστεί. Η ίνα εκτίθεται για 5 λεπτά και έπειτα εισάγεται στο επόμενο δείγμα για 40 λεπτά. Η χρωματογραφική ανάλυση διαρκεί 23 λεπτά με τις συνθήκες να έχουν ρυθμιστεί όπως φαίνονται παρακάτω.

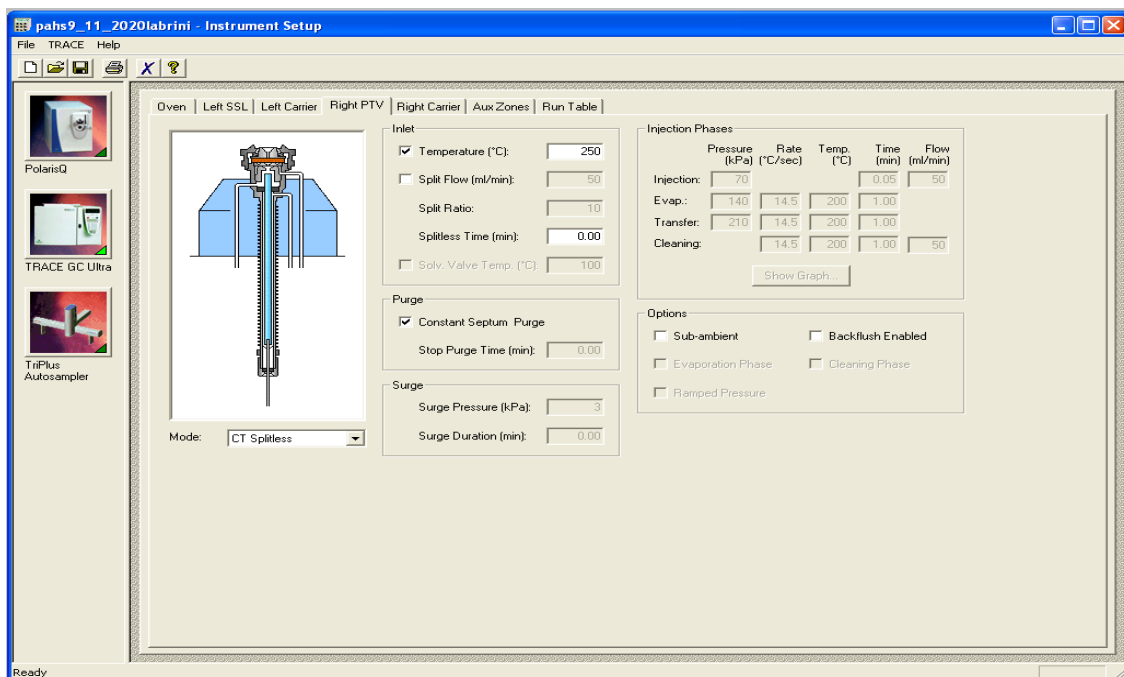
BHMA 1: Πριν τη χρωματογραφική ανάλυση απαραίτητη προϋπόθεση αποτελεί η επιλογή των βέλτιστων συνθηκών. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα του GC (Trace GC Ultra) και προσαρμόζουμε καταλλήλως τις συνθήκες για το MS (Polaris Q) μέσα από το Instrument Setup του λογισμικού X-Calibur (Εικόνα 8.3).



Εικόνα 8.3: Αρχική οθόνη του λογισμικού X-Calibur

ΒΗΜΑ 2α: Συνθήκες GC(Trace GC Ultra) – θερμοκρασιακό πρόγραμμα φούρνου



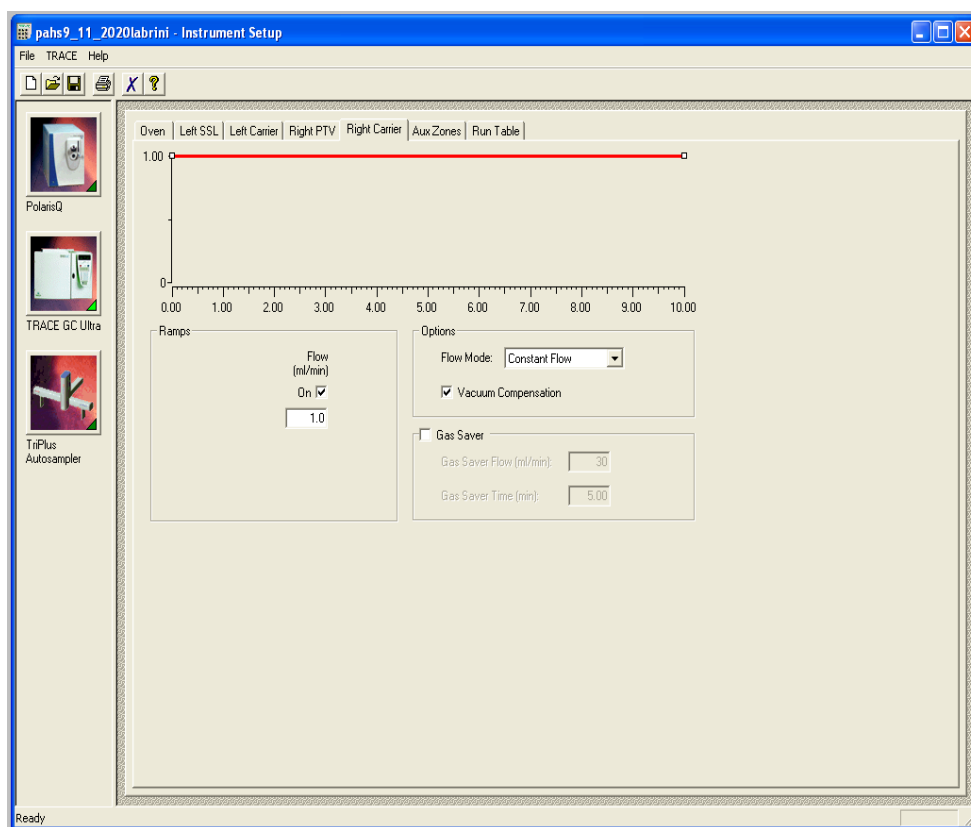


Εικόνα 8.4: Απεικόνιση θερμοκρασιακού προγράμματος GC.

Αρχικά, ρυθμίζουμε τη θερμοκρασία του φούρνου (**Εικόνα 8.4**) στους 100 °C και τη διατηρείται σταθερή για 1 λεπτό. Στη συνέχεια αυξάνετε η θερμοκρασία με ρυθμό 30 °C/min έως τους 205 °C και έπειτα με ρυθμό 80°C/min έως τους 330 °C, όπου και διατηρείται τη θερμοκρασία σταθερή για 1 λεπτό.

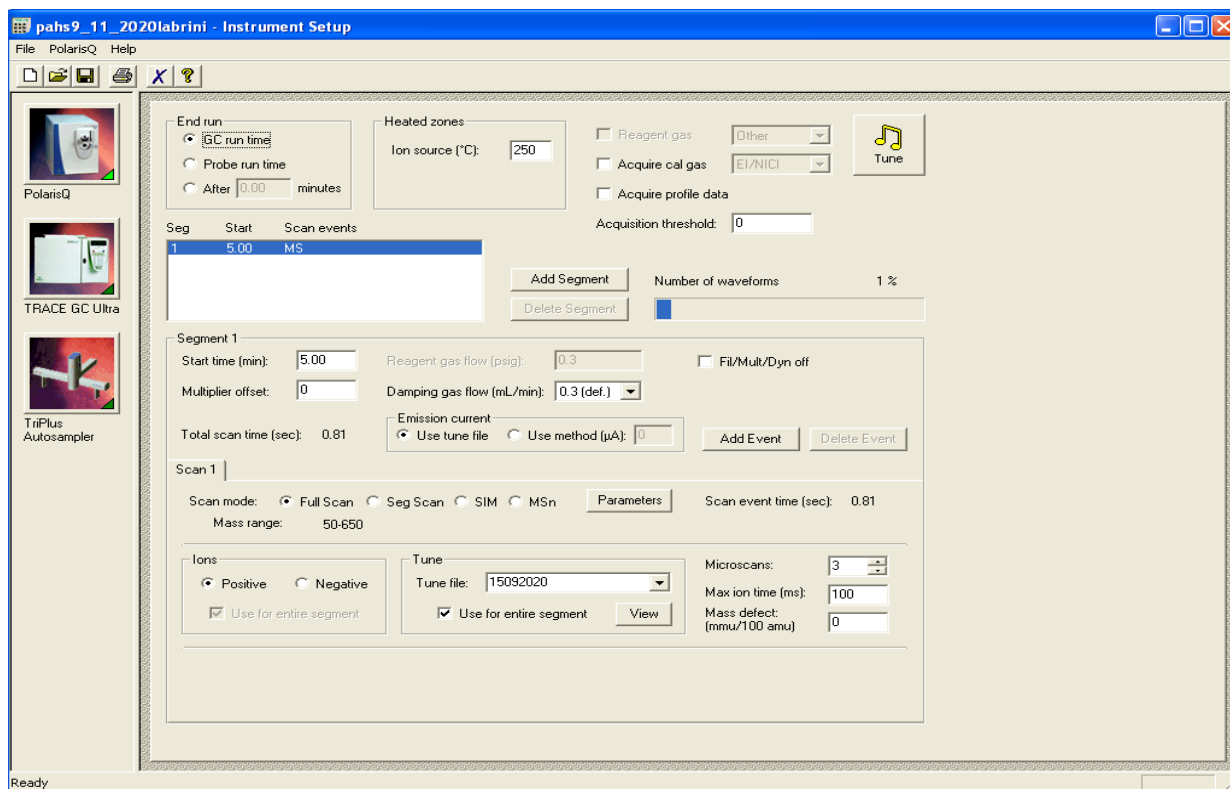
BHMA 2β: Στη συνέχεια ρυθμίστηκε το πρόγραμμα για τον εισαγωγέα του δείγματος (**Εικόνα 8.5**) Ως θερμοκρασία εισόδου ορίστηκε 250°C, mode: CTSplitless. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας έγχυσης, η έξοδος split είναι κλειστή για να εισαχθεί το μεγαλύτερο μέρος του δείγματος στη στήλη με σκοπό την ανίχνευση ενώσεων πολύ μικρών συγκεντρώσεων.

ΒΗΜΑ 2γ: Έπειτα ρυθμίστηκε το φέρον το αέριο της κινητής φάσης το οποίο ευθύνεται για την μεταφορά των αναλυόμενων ουσιών διαμέσου της στήλης GC. Στο πρόγραμμα του φέροντος αερίου (**Εικόνα 8.6**) διατηρήθηκε σταθερή ροή (flow 1.0ml/min).



Εικόνα 8.5: Απεικόνιση συνθηκών του εισαγωγέα του δείγματος

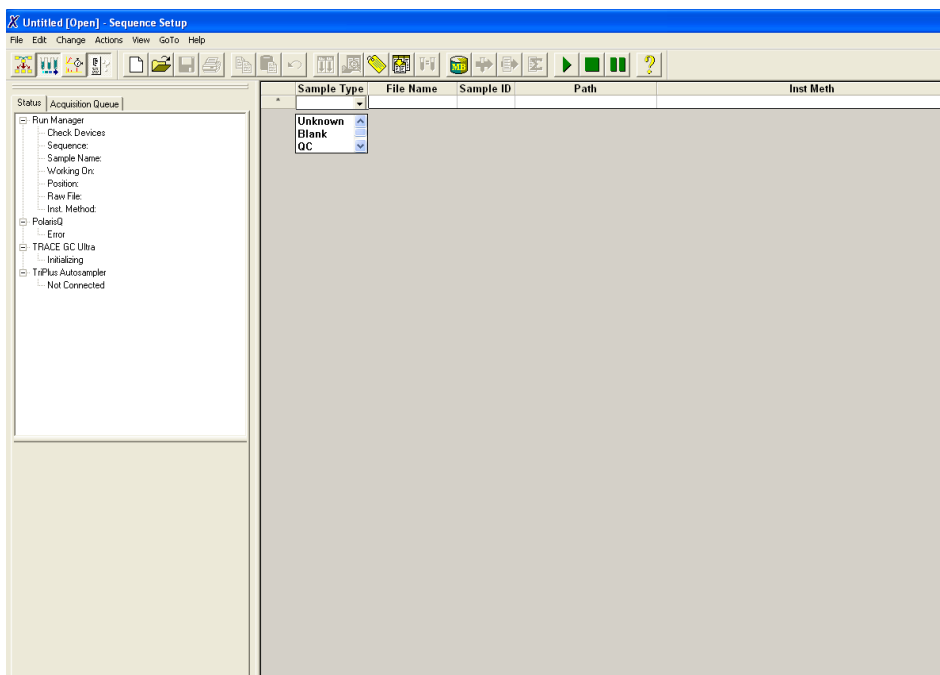
ΒΗΜΑ 2δ: Συνθήκες MS (Polaris Q)



Εικόνα 8.7: Απεικόνιση συνθηκών του MS.

Τέλος, ρυθμίστηκαν από το πρόγραμμα για το MS (Εικόνα 8.7) οι συνθήκες και οι παράμετροι παραλαβής των φασμάτων μαζών για τις αναλυόμενες ουσίες. Το MS αρχίζει να σαρώνει μετά από 5 λεπτά από την έναρξη της χρωματογραφικής ανάλυσης στους 250°C.

ΒΗΜΑ 3: ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ (SEQUENCE)

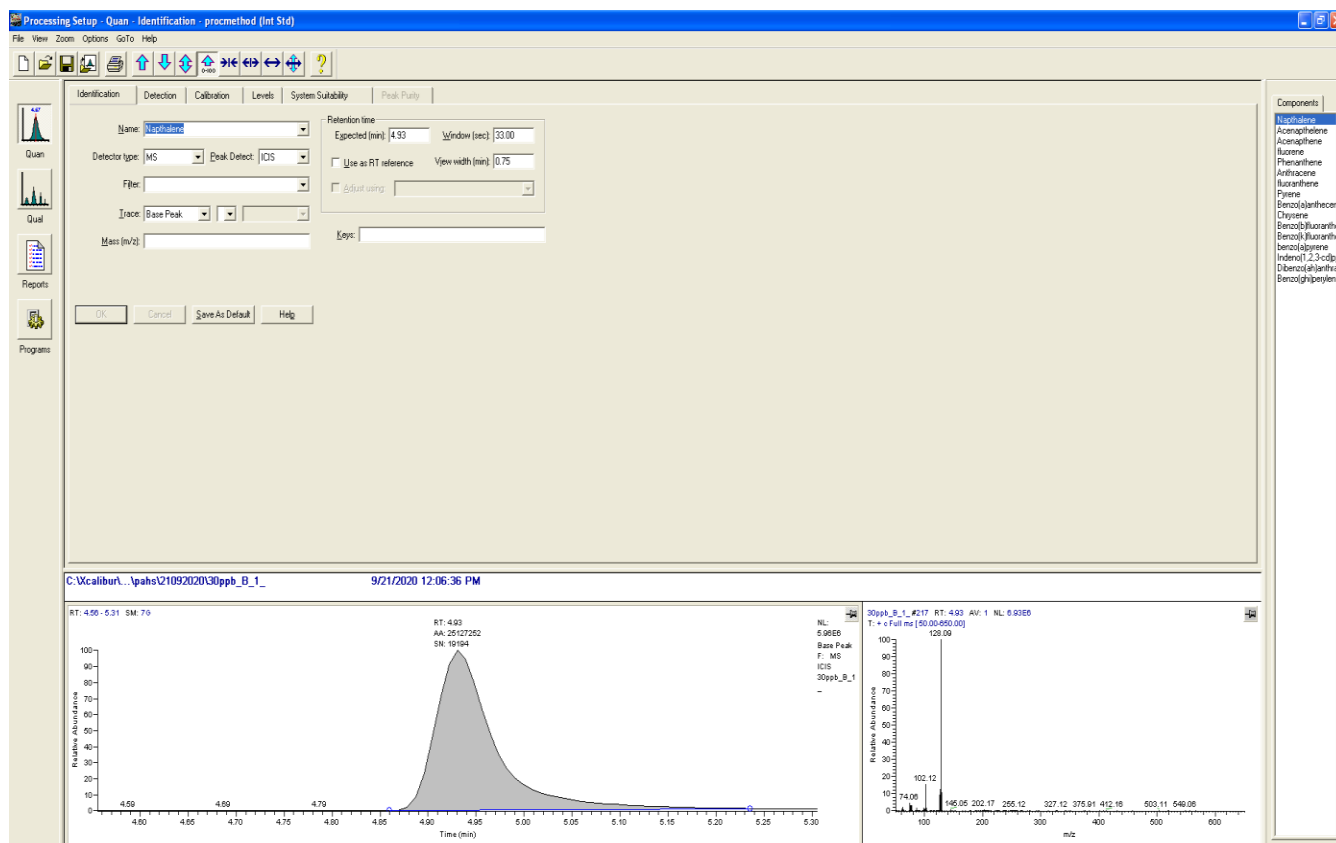


Εικόνα 8.8: Απεικόνιση συνθηκών αρχικής σελίδας δημιουργίας sequence.

Η δημιουργία ενός αρχείου sequence (**Εικόνα 8.8**) πραγματοποιείται από την αρχική σελίδα του λογισμικού X-Calibur επιλέγοντας το Sequence Setup. Έπειτα, επιλέγετε ο τύπος του δείγματος (Sample Type) ανάλογα με τη χρωματογραφική ανάλυση που πρόκειται να γίνει. Το Std. Bracket επιλέγεται για standard δείγματα της καμπύλης βαθμονόμησης, Blank για το τυφλό και Unknown για τα άγνωστα δείγματα. Στη συνέχεια ορίζεται το μέρος όπου θα αποθηκευτεί το αρχείο στη βάση δεδομένων (Path) και επιλέγεται η μέθοδος που θα ακολουθήσει το πρόγραμμα (Instr. Method).

ΒΗΜΑ 4: ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Με το “Processing Setup” ρυθμίζονται οι συνθήκες του Quan Browser (**Εικόνα 8.9**) για τη παραλαβή των δεδομένων από το Qual Browser (π.χ επιλέγοντας τη ταυτοποίηση (Identification) δίνουμε όνομα στην προσδιοριζόμενη ουσία, ρυθμίζουμε τον αναμενόμενο χρόνο παραλαβής αυτής, το τύπο του ανιχνευτή, το m/z κ.α.).



Εικόνα 8.9: Απεικόνιση συνθήκες του Quan Browser.

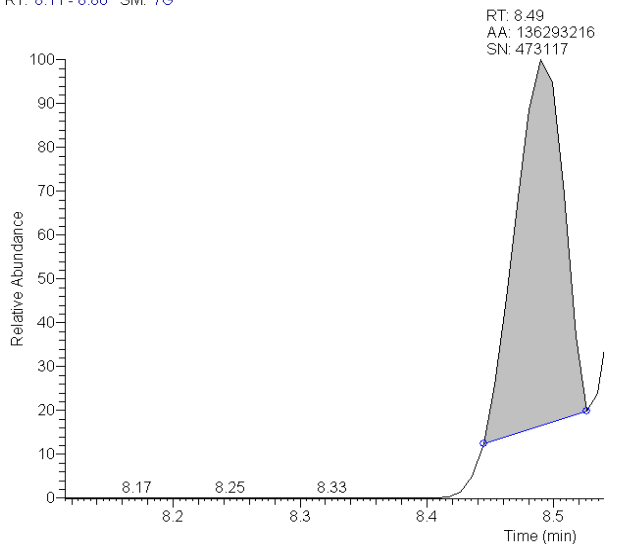
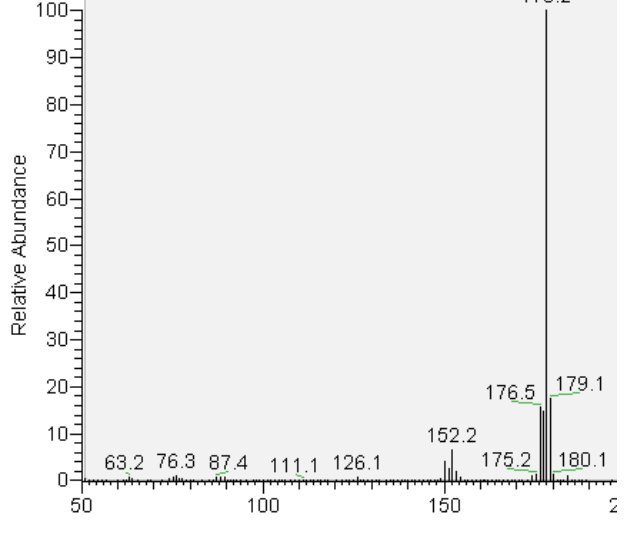
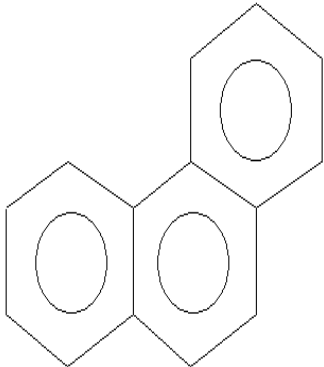
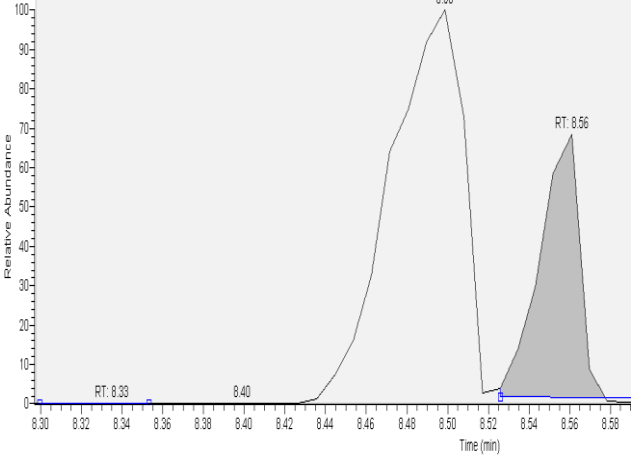
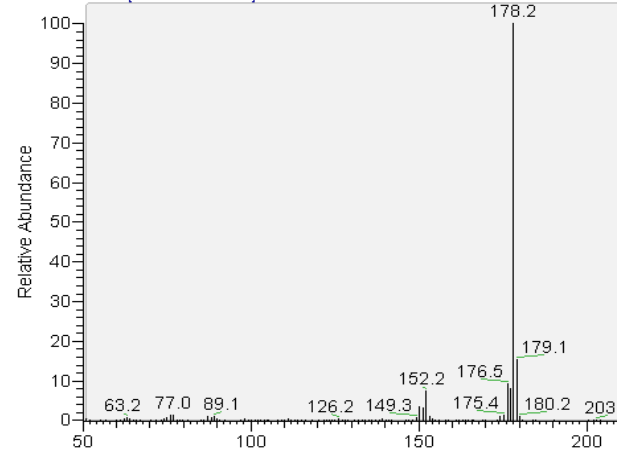
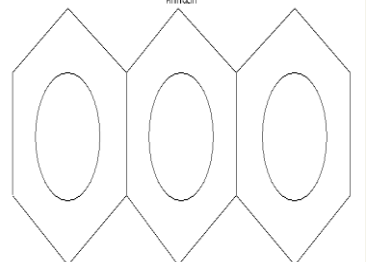
8.4: Ταυτοποίηση Πρότυπων Ενώσεων

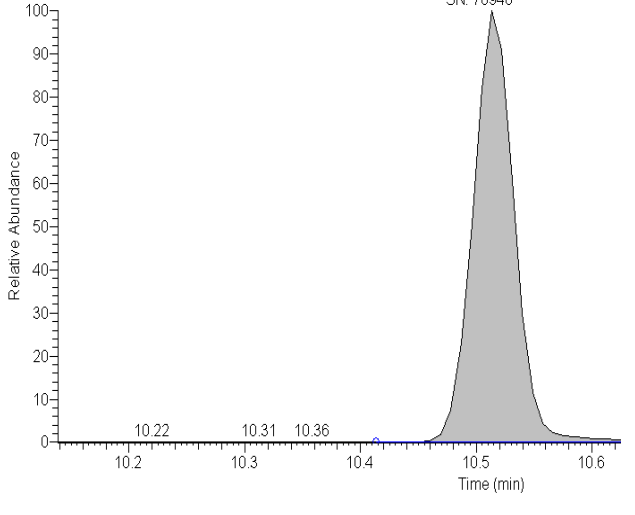
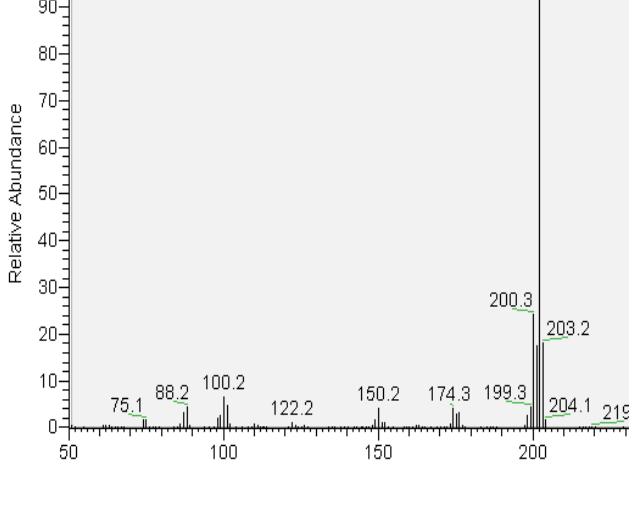
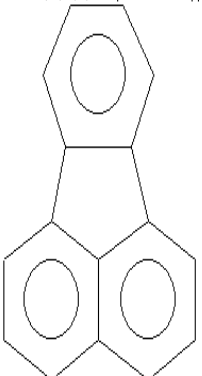
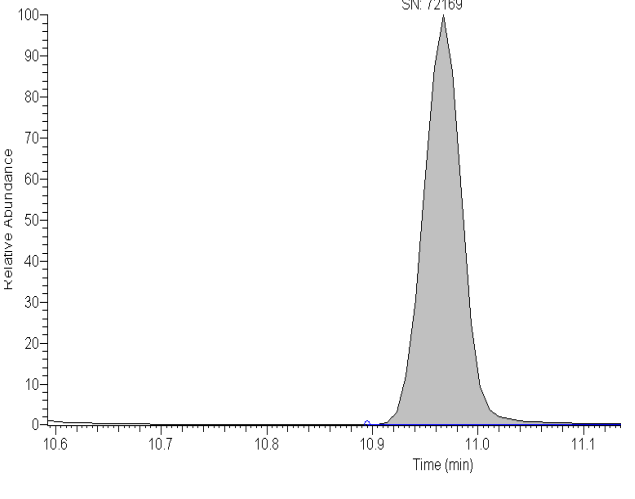
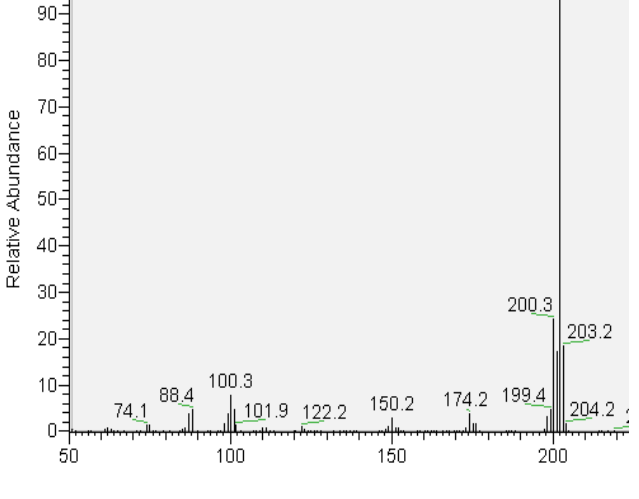
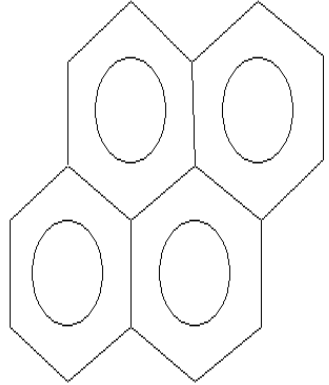
Σε κάθε φιαλίδιο που φέρει πώμα με ελαστικό διάφραγμα από PTFE τοποθετήθηκαν 100ng/mL πρότυπου διαλύματος (Agilent) σε 15mL υπερκάθαρου νερού ακολούθησε η τεχνική της HS-SPME για 40 λεπτά, σε θερμοκρασία 36 °C. Η ανάλυση ολοκληρώθηκε στον αέριο χρωματογράφο (με την έκθεση της ίνας για 5 λεπτά) συζευγμένο με φασματόμετρο μάζας (GC-MS) και η ταυτοποίηση των ενώσεων έγινε με τη βοήθεια της βάσης φασμάτων μάζας (Πίνακας 3).

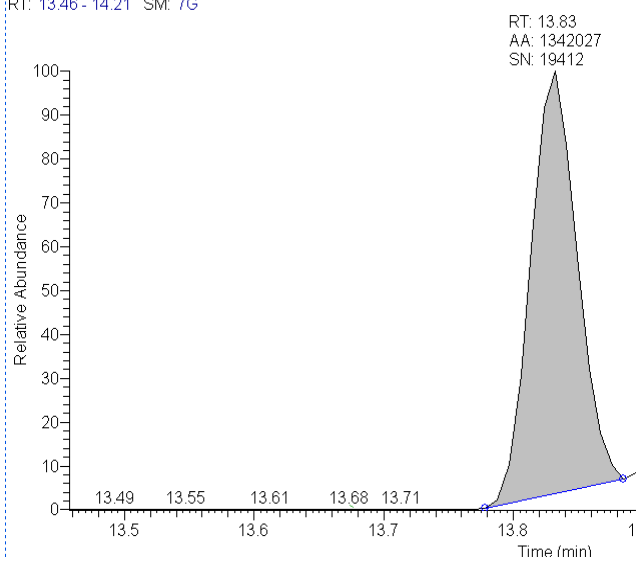
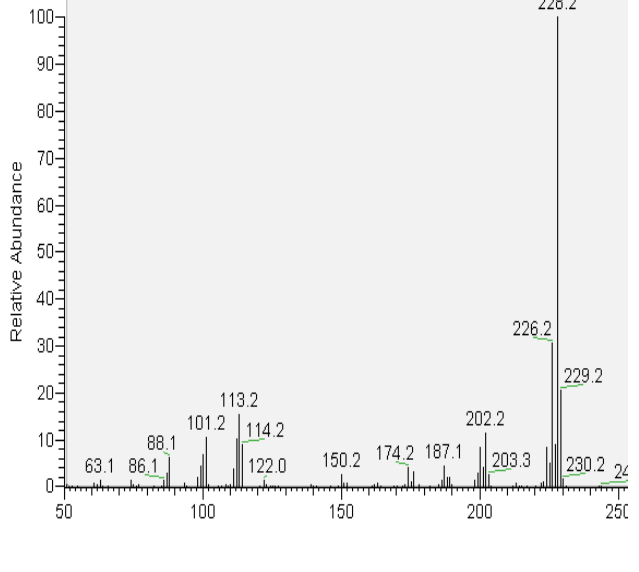
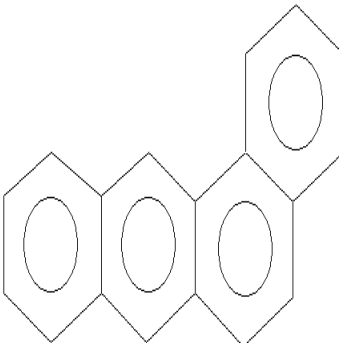
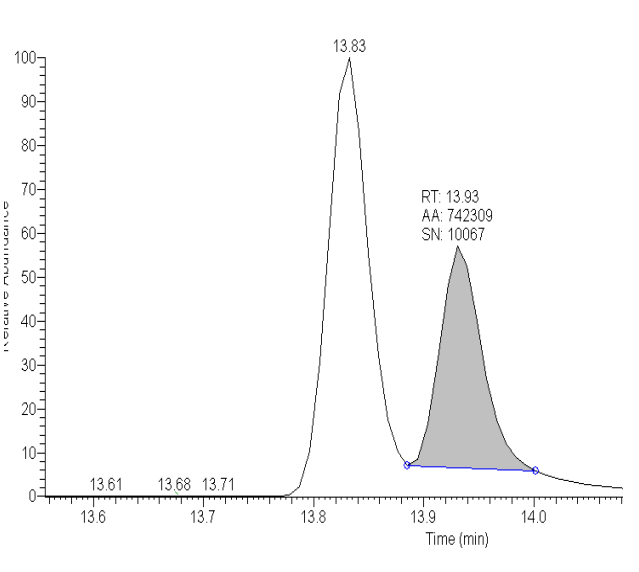
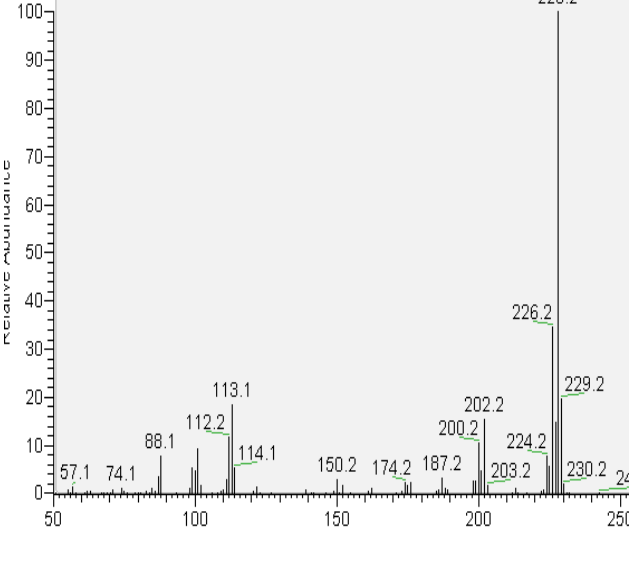
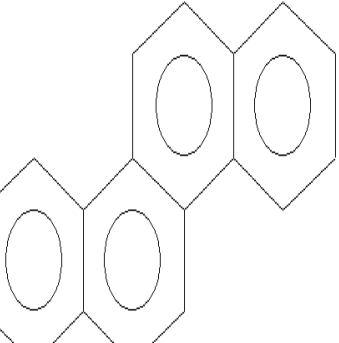
ΠΙΝΑΚΑΣ 8.1: ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

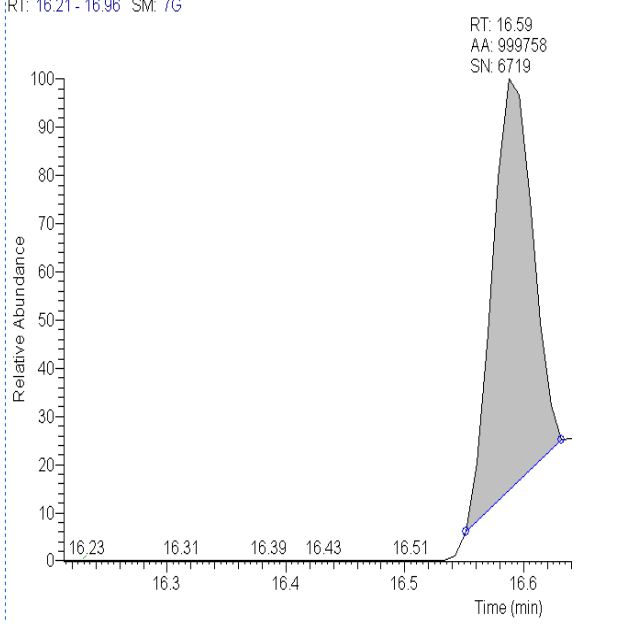
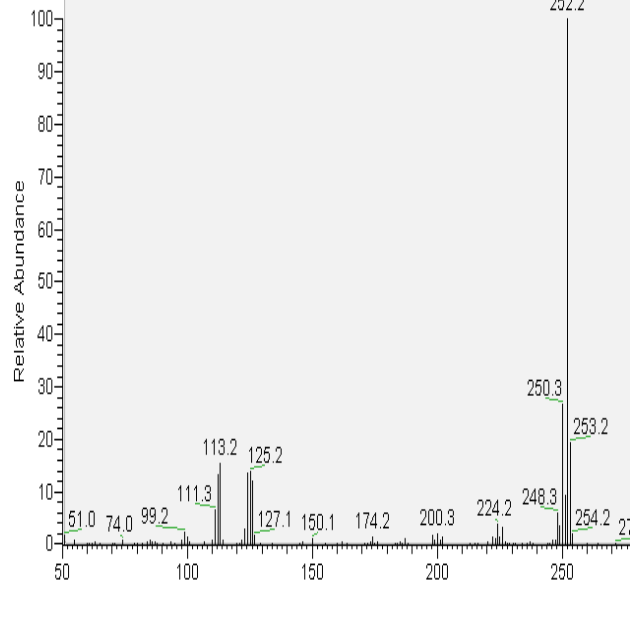
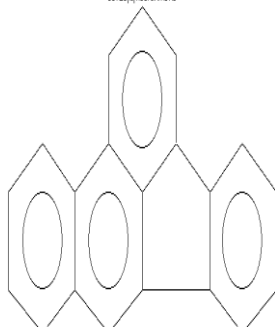
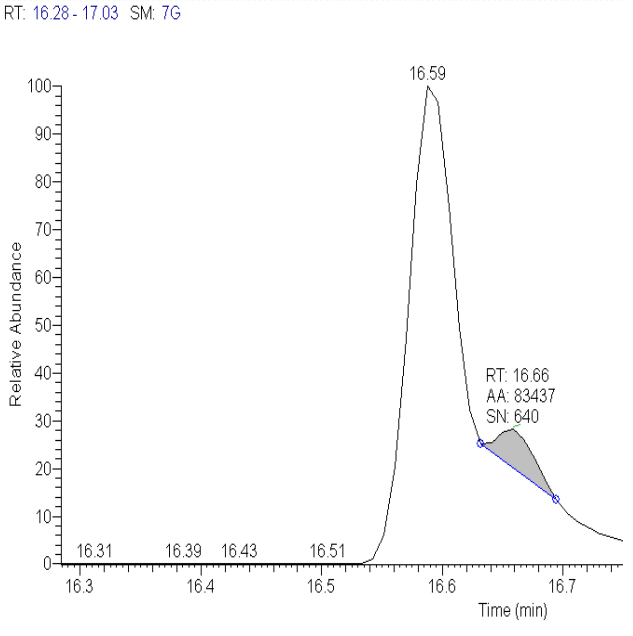
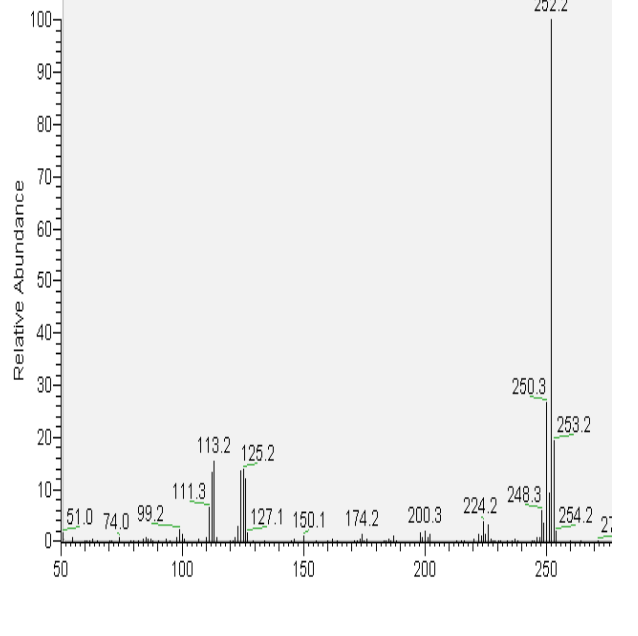
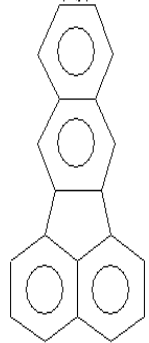
	Chromatography	Spectrum	Substance
Naphthalene RT: 4.95 Quantification Ion: 128 Confirmation Ions(s):129, 127			<p>Naphthalene Formula C₁₀H₈, MW 128, CAS# 91-20-3, Entry# 17375 Alkocarbon</p>
Acenaphthelene RT: 6.58 Quantification Ion: 152 Confirmation Ions(s): 151,153			<p>Acenaphthylene Formula C₁₂H₈, MW 152, CAS# 208-96-8, Entry# 20150 Cyclopenta[de]naphthalene</p>

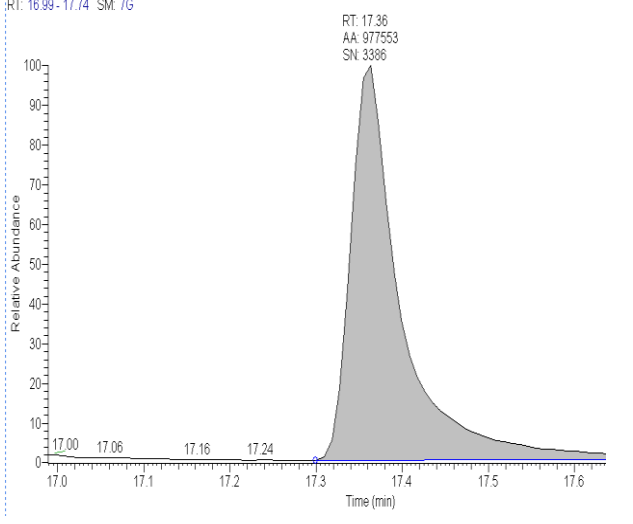
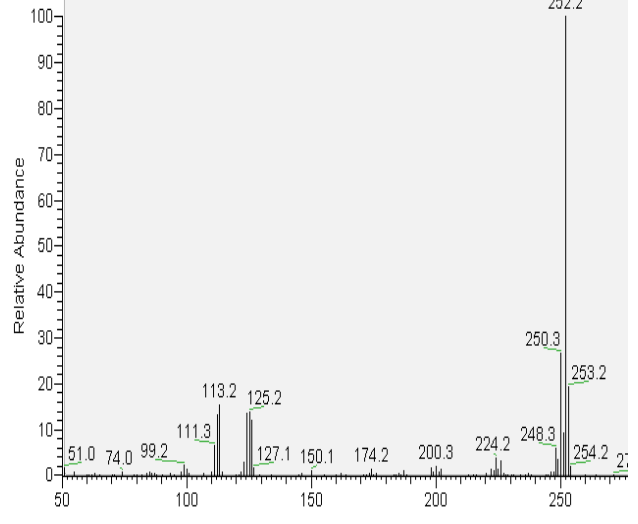
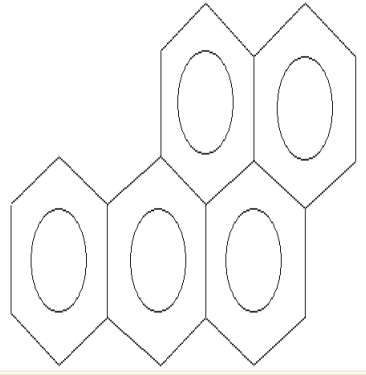
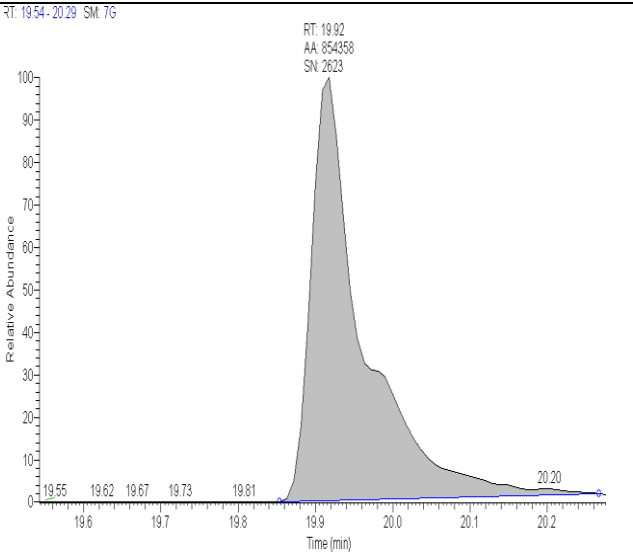
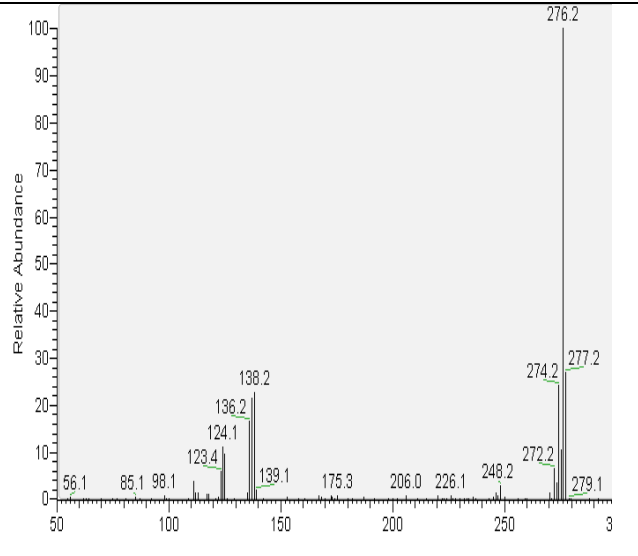
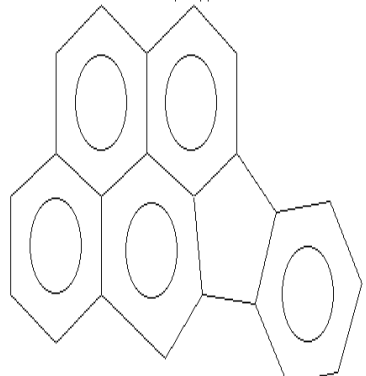
<p>Acenaphthene</p> <p>RT: 6.58</p> <p>Quantification Ion: 153</p> <p>Confirmation Ions(s): 155,151</p>	<p>RT: 6.77 AA: 101639008 SN: 544915</p>	<p>153.3</p>	<p>Acenaphthene Formula C₁₂H₁₀, MW 154, CAS# 83-32-9, Entry# 20368 Acenaphthylene, 1,2-dihydro-</p>
<p>Fluorene</p> <p>RT: 7.29</p> <p>Quantification Ion: 165</p> <p>Confirmation Ions(s): 166,167,163</p>	<p>RT: 7.29 AA: 100439697 SN: 634022</p>	<p>165.3</p>	<p>1H-Phenylene Formula C₁₃H₁₀, MW 166, CAS# 203-80-5, Entry# 106073 Phenylene</p>

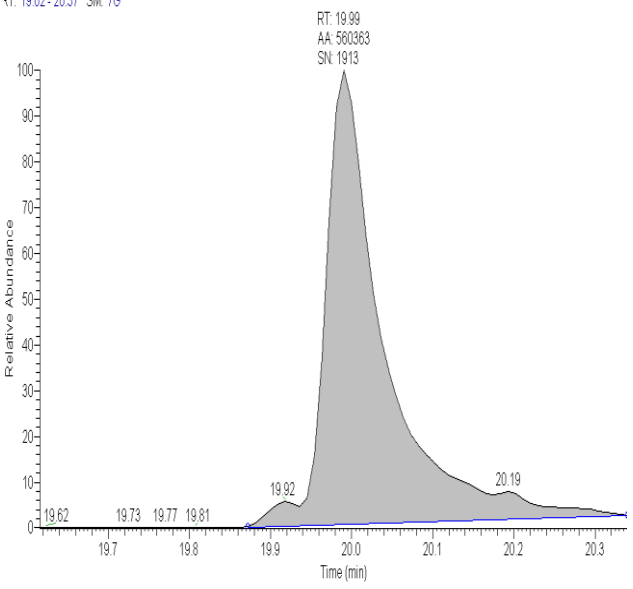
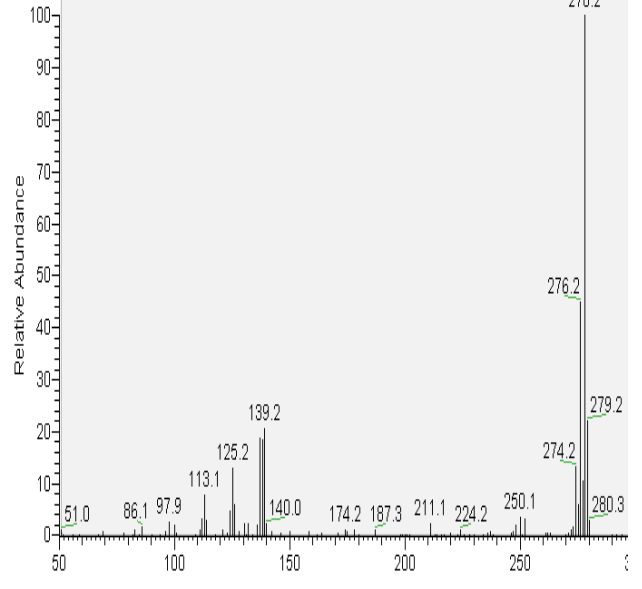
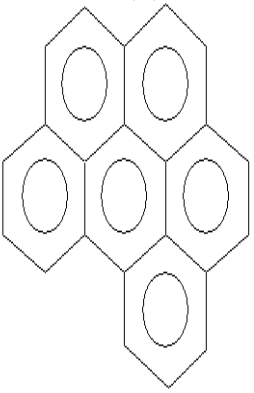
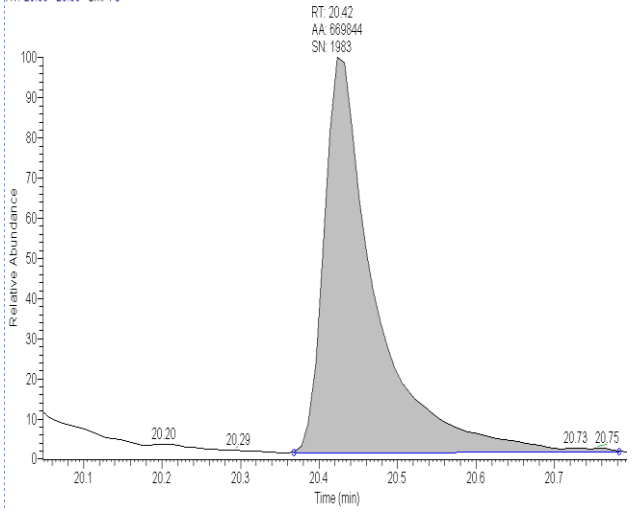
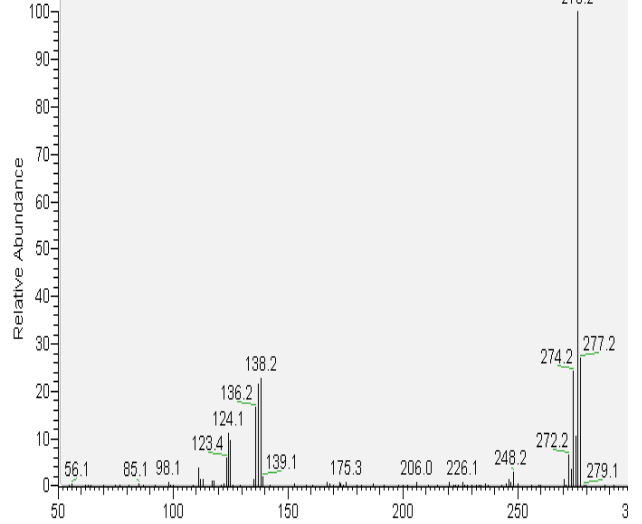
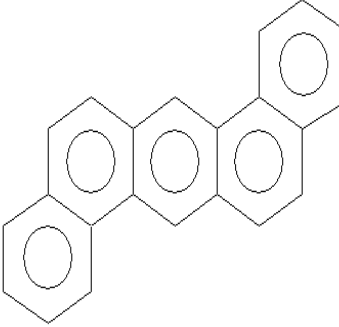
<p>Phenanthrene</p> <p>RT: 8.49</p> <p>Quantification Ion: 178</p> <p>Confirmation Ions(s): 176, 179</p>	<p>RT: 8.11 - 8.86 SM: 76</p> 		<p>Phenanthrene Formula C₁₄H₁₀, MW 178, CAS# 85-01-8, Entry# 22364 Phenanthren</p> 
<p>Anthracene</p> <p>RT: 8.49</p> <p>Quantification Ion: 178</p> <p>Confirmation Ions(s): 176,179</p>		<p>T: + c Full ms [50.00-650.00]</p> 	<p>Anthracene Formula C₁₄H₁₀, MW 178, CAS# 120-127-5, Entry# 113241 Anthracen</p> 

<p>Fluoranthene</p> <p>RT: 10.52</p> <p>Quantification Ion: 202</p> <p>Confirmation Ions(s): 200,203</p>	<p>RT: 10.14 - 10.89 SM: 76</p> <p>RT: 10.51 AA: 11442410 SN: 70948</p> 		<p>Fluoranthene</p> <p>Formula C₁₆H₁₀, MW 202, CAS# 206-44-0, Entry# 124722</p> <p>Benzene, 1,2-[1,8-naphthalenediyl]-</p> 
<p>Pyrene</p> <p>RT: 10.97</p> <p>Quantification Ion: 202</p> <p>Confirmation Ions(s): 200,203</p>	<p>RT: 10.59 - 11.34 SM: 76</p> <p>RT: 10.97 AA: 11710755 SN: 72169</p> 		<p>Pyrene</p> <p>Formula C₁₆H₁₀, MW 202, CAS# 129-00-0, Entry# 23990</p> <p>β-Pyrene</p> 

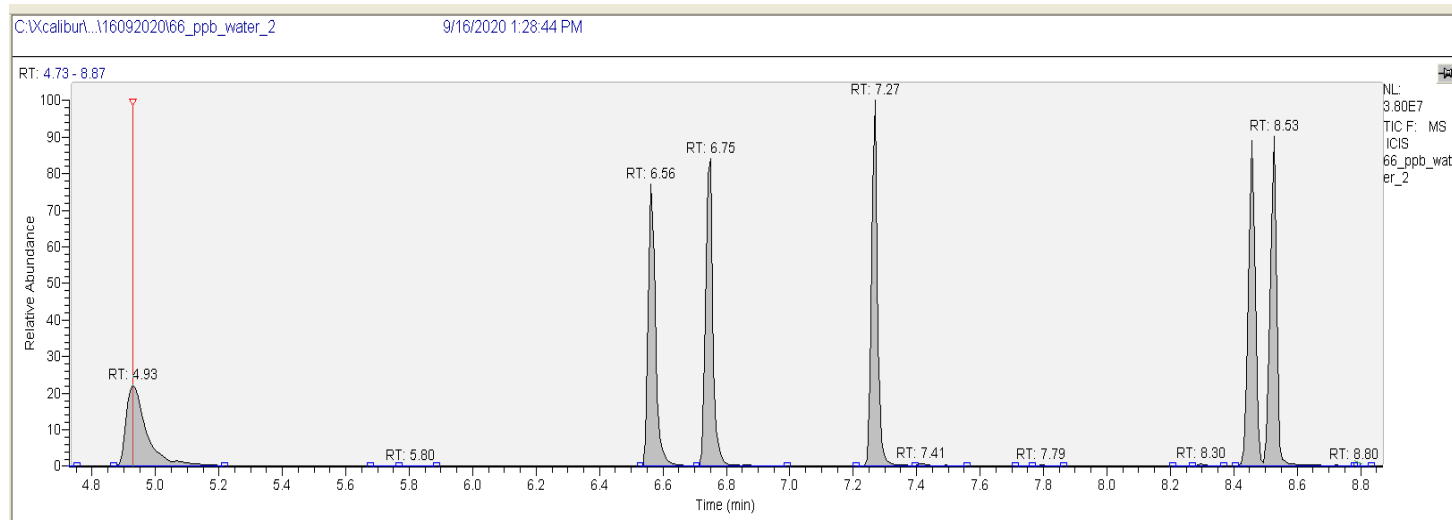
<p>Benzo(a)anthecene</p> <p>RT: 13.93</p> <p>Quantification Ion: 228</p> <p>Confirmation Ions(s): 226,229</p>	<p>RT: 13.46 - 14.21 SM: 76</p> 		<p>Benzo(a)anthracene Formula C₁₈H₁₂, MW 228, CAS# 56-55-3, Entry# 134085 Benzo(a)anthracene</p> 
<p>Chrysene</p> <p>RT: 13.93</p> <p>Quantification Ion: 228</p> <p>Confirmation Ions(s): 226,229</p>	<p>RT: 13.56 - 14.31 SM: 76</p> 		<p>Chrysene Formula C₁₈H₁₂, MW 228, CAS# 218-01-9, Entry# 25102 Benzo(a)phenanthrene</p> 

<p>Benzo(b)fluoranthene</p> <p>RT: 16.59</p> <p>Quantification Ion: 228</p> <p>Confirmation Ions(s): 253,250</p>	<p>RT: 16.21 - 16.96 SM: 7G</p> 		<p>Benzo(a)acephenanthylene Formula C20H12, MW 252, CAS# 205-99-2, Entry# 2980</p> <p>Benzo(b)fluoranthene</p> 
<p>Benzo(k)fluoranthene</p> <p>RT: 16.66</p> <p>Quantification Ion: 252</p> <p>Confirmation Ions(s): 252, 250</p>	<p>RT: 16.28 - 17.03 SM: 7G</p> 		<p>Benzo(k)fluoranthene Formula C20H12, MW 252, CAS# 207-08-9, Entry# 141102</p> <p>Dibenzo(b,h)fluorene</p> 

<p>benzo(a)pyrene</p> <p>RT: 17.36</p> <p>Quantification Ion: 252</p> <p>Confirmation Ions(s): 250,253</p>	<p>RT: 16.99 - 17.74 SM: 76</p> 		<p>benzo(a)pyrene Formula C₂₀H₁₂, MW 252, CAS# 50-32-8, Entry# 141100</p> 
<p>Indeno(1,2,3-cd)pyrene</p> <p>RT: 19.92</p> <p>Quantification Ion: 276</p> <p>Confirmation Ions(s): 277,274</p>	<p>RT: 19.54 - 20.29 SM: 76</p> 		<p>Indeno[1,2,3-cd]pyrene Formula C₂₂H₁₂, MW 276, CAS# 193-39-5, Entry# 146825</p> <p>o-Phenylene pyrene</p> 

<p>Dibenzo(ah)anthracene</p> <p>RT: 19.99</p> <p>Quantification Ion: 278</p> <p>Confirmation Ions(s): 279,276</p>	<p>RT: 19.62-20.37 SM: 76</p> 		<p>Benzo[ghi]perylene Formula C22H12, MW 276, CAS# 191-24-2, Entry# 26396 Benzo-[1,12]-perylene</p> 
<p>Benzo(ghi)perylene</p> <p>RT: 20.42</p> <p>Quantification Ion: 276</p> <p>Confirmation Ions(s): 277,274</p>	<p>RT: 20.05-20.80 SM: 76</p> 		<p>Dibenzo[a,h]anthracene Formula C22H14, MW 278, CAS# 53-70-3, Entry# 26452 Dibenzo[a,h]anthracene</p> 

Στην εικόνα 8.10 παρουσιάζεται το χρωματογράφημα και το φάσμα μάζας των παραπάνω πρότυπων ουσιών συγκέντρωσης όπου έχει επισημανθεί ο χρόνος έκλουσης που αναμένεται σύμφωνα με τη βιβλιογραφία να αντιστοιχεί στην κορυφή.



Εικόνα 8.10: Χρωματογράφημα πρότυπου δείγματος.

ΕΝΟΤΗΤΑ 9: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με βάση την ανασκόπηση της σύγχρονης βιβλιογραφίας που πραγματοποιήθηκε, θα μπορούσαν να εξαχθούν τα ακόλουθα συμπεράσματα για τις μεθοδολογίες που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό και ποσοτικοποίηση των PAHs σε υδατικά διαλύματα:

- Η πλειονότητα των μεθόδων είναι χρωματογραφικές.
- Η συχνότερη μέθοδος είναι με GC λόγω της πτητικότητας των ενώσεων.
- Η ανίχνευση των PAHs πραγματοποιείται συχνότερα με MS.
- Οι χρωματογραφικές μέθοδοι έχουν ικανοποιητικά όρια ανίχνευσης.
- Με χρωματογραφικές μεθόδους η ανάλυση πραγματοποιείται συνήθως σε μερικά λεπτά.
- Δεν απαιτείται εκτεταμένη προεπεξεργασία των δειγμάτων σε κάποιες εκχυλίσσεις όπως η SPME.
- Η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση των PAHs είναι αναγκαία λόγω της τοξικότητας αυτών των ενώσεων.
- Αναπτύχθηκε μεθοδολογία ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης PAHs με την χρήση GC-MS με εκχύλιση SPME και ταυτοποιήθηκαν οι ενώσεις

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adeniji AO., Okoh O., Okoh AI, 2017, Analytical methods for the determination of the distribution of total petroleum hydrocarbons in the water and sediment of aquatic systems: A review. *Journal of Chemistry*. 2017; Article ID 5178937: 13 pages
- Adeniji AO, Okoh OO, Okoh AI, 2018. Analytical Methods for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and their Global Trend of Distribution in Water and Sediment: A Review. *INTECH* 2018. DOI: 10.5772/intechopen.71163
- Aemig Q, Chéron C, Delgenès N, Jimenez J, Houot S, Steyer JP, Patureau D. Distribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in sludge organic matter pools as a driving force of their fate during anaerobic digestion. *Waste Manag.* 2016 Feb;48:389-396
- Al – Bukhaiti WQ, Noman Anwar, Qasim AS, Al – Farga AL, 2017. Gas Chromatography: Principles, Advantages and Applications in Food Analysis. *International Journal of Agriculture Innovations and Research* 2017;6(1):123-128
- Al – Fekaiki, 2014. Application of Gas chromatography mass spectrometry (GC MS) in food science and biotechnology. DOI: 10.13140/RG.2.2.35663.07844
- Al-Saleh, I., Alsabbahen, A., Shinwari, N., Billedo, G., Mashhour, A., Al-Sarraj, Y., El Din Mohamed, G. & Rabbah, A. (2013), “Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) as determinants of various anthropometric measures of birth outcome”, *Science of the Total Environment*, 444, pp: 565–578

Alexandrov K, Rojas M, Rolando Ch.: "DNA Damage by Benzo(a)pyrene in Human Cells is Increase by Cigarette Smoke and Decreased by a Filter Containing Rosemary Extract, which Lowers Free Radicals", *Cancer Res* 66:11938-11945, 2006

Ana GREE, Sridhar MKC, Emerole GO, 2011. Contamination of surface waters by polycyclic aromatic hydrocarbons in two Nigerian coastal communities. *Journal of Environmental Health Research*. 2011;11(2):77-86

Baek, S.O., Field, R.A., Goldstone, M.E., Kirk, P.W., Lester, J.N. & Perry, R. (1991), "A review of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Sources, fate and behavior", *Water, Air, and Soil Pollution*, 60, pp: 279–300

Banerjee K., Sagar Utture, Soma Dasgupta, Chandrasekar Kandaswamy, Saswati Pradhan, Sunil Kulkarni, Pandurang Adsule, Multiresidue determination of 375 organic contaminants including pesticides, polychlorinated biphenyls and polyaromatic hydrocarbons in fruits and vegetables by gas chromatography–triple quadrupole mass spectrometry with introduction of semi-quantification approach, *Journal of Chromatography A*, Volume 1270, 2012, Pages 283-295

Baumard, P., Budzinski, H., Michon, Q., Garrigues, P., Burgeot, T., & Bellocq, J. (1998). Origin and Bioavailability of PAHs in the Mediterranean Sea from Mussel and Sediment Records. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 47, 77–90

Beyer, J., Jonsson, G., Ported, C., Krahn, M.M., Ariese, F. (2010), "Analytical methods for determining metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) pollutants in fish bile: A review", *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 30, pp: 224–244

- Braga, R.S., Barone, P.M.V.B. & Galvao, D.S. (2000), “Identifying carcinogenic activity of methylated and non-methylated polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) through electronic and topological indices”, *Brazilian Journal of Physics*, 30(3), pp. 560 – 568.
- Bispo JRL, Navickiene S, Dórea HS, 2011. Method validation for SPE applied to determination of PAH in petroliferous industry effluent water. *American Journal of Analytical Chemistry*. 2011;2:971-978
- Buddhadasa S, 2002. Methodologies for the Analysis of Petroleum Hydrocarbons Extracted from Contaminated Soils [Thesis]. Australia: Victoria University of Technology; 2002
- Cai S, Syage JA, Hanold KA, Balogh MP, 2009. Ultra-performance liquid chromatography atmospheric pressure photo ionization-tandem mass spectrometry for high-sensitivity and high-throughput analysis of U.S. Environmental Protection Agency 16 priority pollutants polynuclear aromatic hydrocarbons. *Analytical Chemistry*. 2009;81:2123-2128
- Cam D, Gagni S, Meldolesi L, Galletti G, 2000. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment using solid-phase microextraction with gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatographic Science*. 2000;38:55-60
- Castells, P., Santos, F.J. & Galceran, M.T. (2003), “Development of a sequential supercritical fluid extraction method for the analysis of nitrated and oxygenated derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban aerosols”, *Journal of Chromatography*, 1010(2), pp: 141-151

- Cheng C, Lai J, Huang M, Oung J, Shiea J, 2012. Chapter 6: Analysis of polar components in crude oil by ambient mass spectrometry. In: Abdel-Raouf ME-S, editor. Crude Oil Emulsions— Composition Stability and Characterization. 2012. p. 107-121
- Cheng D, Chih F, Chiu C, 2012. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in industrial harbor sediments by GC-MS. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2012;9:2175-2188
- Church J., Wang X., Calderon J., Lee Woo H., Cho Hyoung J., Zhai, Lei, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2016, Volume 16, Number 2, pp. 1620-1623
- Courter, L.A., Musafia-Jeknic, T., Fischer, K., Bildfell, R., Giovanini, J., Pereira, C. & Baird, W.M. (2007), "Urban dust particulate matter alters PAH-induced carcinogenesis by inhibition of CYP1A1 and CYP1B1", *Toxicological Sciences*, vol. 95, no. 1, pp. 63-73.
- De Boer, J. & Wagelmans, M. (2016), "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil – Practical Options for Remediation", *Clean - Soil, Air, Water*, vol. 44, no. 6, pp. 648-653.
- Denis Elizabeth H., Jaime L. Toney, Rafael Taroza, R. Scott Anderson, Lydia D. Roach, Yongsong Huang, Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in lake sediments record historic fire events: Validation using HPLC-fluorescence detection, *Organic Geochemistry*, Volume 45, 2012, Pages 7-17
- Dipple, A. (1985), "Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Carcinogenesis", *Polycyclic Hydrocarbons and Carcinogenesis - ACS Symposium Series*, American Chemical Society, 283, pp: 1–17

- Dong C, Chen C, Chen C, 2012. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in industrial harbor sediments by GC-MS. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2012;9:2175-2188
- Emmenegger C, Kalberer M, Morrical B, Zenobi R, 2003. Quantitative analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water in the low-nanogram per liter range with two-step laser mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2003;75:4508-4513
- Franke, R. (1973), "Structure-activity relationships in polycyclic aromatic hydrocarbons: Induction of microsomal aryl hydrocarbon hydroxylase and its possible importance in chemical carcinogenesis", *Chemico-biological interactions*, vol. 6, no. 1, pp. 1-17.
- Fernández-González V., E. Concha-Graña, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, Solid-phase microextraction–gas chromatographic–tandem mass spectrometric analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons: Towards the European Union water directive 2006/0129 EC, *Journal of Chromatography A*, Volume 1176, Issues 1–2, 2007, Pages 48-56
- Janfelt Christian , Rune Graesboll, Frants R. Lauritsen, Characterization and optimization of membrane inlets for a miniature ion trap mass spectrometer operating at a high background pressure of humid air, *International Journal of Mass Spectrometry*, Volume 276, Issue 1,n2008,Pages 17-23
- Filipkowska A, Lubecki L, Kowalewska G, 2005. Polycyclic aromatic hydrocarbon analysis in different matrices of the marine environment. *Analytica Chimica Acta*. 2005;547(2):243-254

- Gorleku MA, Carboo D, Palm LMN, Quasie WJ, Armah AK, 2014. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) pollution in marine waters and sediments at the Tema Harbour, Ghana. *Academia Journal of Environmental Sciences*. 2014;2(7):108-115
- Guadalupe María Guatemala-Morales, Elisa Alejandra Beltrán-Medina, Mario Alfonso Murillo-Tovar, Priscilla Ruiz-Palomino, Rosa Isela Corona-González, Enrique Arriola-Guevara, Validation of analytical conditions for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in roasted coffee by gas chromatography–mass spectrometry, *Food Chemistry*, Volume 197, Part A, 2016, Pages 747-753
- Hayakawa, K 2018, *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Environmental Behavior and Toxicity in East Asia* , 1st ed. 2018., Springer Singapore, Singapore
- Han Lijun, Yelena Sapozhnikova, Steven J. Lehotay, Method validation for 243 pesticides and environmental contaminants in meats and poultry by tandem mass spectrometry coupled to low-pressure gas chromatography and ultrahigh-performance liquid chromatography, *Food Control*, Volume 66, 2016, Pages 270-282
- Helvécio C. Menezes, Maria José N. Paiva, Rosimeire R. Santos, Luciano P. Sousa, Susana F. Resende, Juliano A. Saturnino, Breno P. Paulo, Zenilda L. Cardeal, A sensitive GC/MS method using cold fiber SPME to determine polycyclic aromatic hydrocarbons in spring water, *Microchemical Journal*, Volume 110, 2013, Pages 209-214
- Hsu CS and Qiant K, 1993. High-boiling aromatic hydrocarbons characterized by liquid chromatography-thermospray-mass spectrometry. *Energy & Fuels*. 1993;7:268-272

IARC (1984), Polynuclear Aromatic Compounds, Part 3, Industrial Exposures in Aluminium Production, Coal Gasification, Coke Production, and Iron and Steel Founding (Report), Lyon, France: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans

Portet-Koltalo F., K. Oukebdane, L. Robin, F. Dionnet, P.L. Desbène, Quantification of volatile PAHs present at trace levels in air flow by aqueous trapping—SPE and HPLC analysis with fluorimetric detection, *Talanta*, Volume 71, Issue 5, 2007, Pages 1825-1833

Keith, L.H. (2015), "The Source of U.S. EPA's Sixteen PAH Priority Pollutants", *Polycyclic Aromatic Compounds*, vol. 35, no. 2-4, pp: 147-160

Kędziora-Koch, Kamila & Rykowska, Iwona & Wasiak, Wieslaw. (2019). Needle-Trap Device (NTD) Packed with Reduced Graphene Oxide (rGO) for Sample Preparation Prior to the Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) from Aqueous Samples by Gas Chromatography–Mass spectrometry (GC-MS). *Analytical Letters*. 52. 1-18

Khan Z, Troquet J and Vachelard C, 2005. Sample preparation and analytical techniques for determination of polyaromatic hydrocarbons in soils. *Int. J Environ Sci Tech* 2005;2(3):275-286

Kim, K.H., Jahan, S.A., Kabir , E. & Brown, R.J.C. (2013), “A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects”, *Environment International*, 60, pp: 71–80

King, A.J. & Readman, James & Zhou, John. (2004). Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water by Solid Phase Micro-Extraction-Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 523. 259-267

- Klee MS and Blumberg LM, 2002. Theoretical and practical aspects of fast gas chromatography and method translation. *Journal of chromatographic science* 2002;40(5)234-247
- Koike, E., Yanagisawa ,R. & Takano, H. (2014), “Toxicological effects of polycyclic aromatic hydrocarbons and their derivatives on respiratory cells”, *Atmospheric Environment*, xxx, pp: 1-8
- Kouzayha A, Iskandarani M, Mokh S, Rabaa A, Budzinski H, Jaber F, 2011. Optimization of a solid phase extraction method using centrifugation for the determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2011;14:7592-7600
- Kumar B, Verma VK, Gaur R, Kumar S, Sharma CS, Akolkar AB, 2014. Validation of HPLC method for determination of priority polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in waste water and sediments. *Advances in Applied Science Research*. 2014;5(1):201-209
- Kyra A. Murrell, Frank L. Dorman, A comparison of liquid-liquid extraction and stir bar sorptive extraction for multiclass organic contaminants in wastewater by comprehensive two-dimensional gas chromatography time of flight mass spectrometry, *Talanta*, Volume 221, 2021, 121481,
- Kupiec T, 2004. Quality control Analytical Methods: Gas Chromatography, *Int. J. Pharm. Compd* 2004;8(4) 305-309
- López – López J.A., Ogalla-Chozas, E., Lara-Martín P.A. & Pintado-Herrera, M.G. (2017), “Solvent bar micro-extraction (SBME) based determination of PAHs in seawater samples”, *Science of the Total Environment*, 598, pp: 58–63

- Liaud C., Maurice Millet, Stéphane Le Calvé, An analytical method coupling accelerated solvent extraction and HPLC-fluorescence for the quantification of particle-bound PAHs in indoor air sampled with a 3-stages cascade impactor, *Talanta*, Volume 131, 2015, Pages 386-394
- Mahler, B.J., Van Metre, P.C., Bashara, T.J., Wilson, J.T. & Johns, D.A. (2005), "Parking lot sealcoat: An unrecognized source of urban polycyclic aromatic hydrocarbons", *Environmental Science and Technology*, 39(15), pp: 5560-5566.
- Mattioda A. L., Hudgin D. M., Allamandola L. J., Experimental Near-Infrared Spectroscopy of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons between 0.7 and 2.5 μm , *The American Astronomical Society*, 2005, Volume 629, Number 2
- Ma J, Xiao R, Li J, Yu J, Zhang Y, Chen L, 2010. Determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples by solid-phase extraction using multi walled carbon nanotubes as adsorbent coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2010;1217:5462-5469
- Mahgoub HA, 2016. Analytical techniques for identification and quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Chemistry and Chemical Sciences* 2016;6(1):65-72
- Nekhavambe TJ, van Ree T, Fatoki OS, 2014. Determination and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in rivers, surface runoff, and sediments in and around Thohoyandou, Limpopo Province, South Africa. *Water SA*. 2014;40(3):415-425

- Nogueira JMF, 2015. Stir bar sorptive extraction – 15 years making sample preparation more environment friendly. Elsevier
- Ouyang, G. & Pawliszyn, J. (2006), "Recent developments in SPME for on-site analysis and monitoring", *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, vol. 25, no. 7, pp: 692-703.
- Pampanin DM and Sydnés MO, 2013. Polycyclic aromatic hydrocarbons a constituent of petroleum: Presence and influence in the aquatic environment. In: Kutcherov V, Kolesnikov A, editors. *Physical and Theoretical Chemistry: Hydrocarbon*. Croatia: InTech; 2013
- Pavlova A and Ivanova R, 2003. Determination of petroleum hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbons in sludge from wastewater treatment basins. *Journal of Environmental Monitoring*. 2003;25:319-323
- Pitarch Elena , María Inés Cervera, Tania Portolés, María Ibáñez, Mercedes Barreda, Arianna Renau-Pruñonosa, Ignacio Morell, Francisco López, Fernando Albarrán, Félix Hernández, Comprehensive monitoring of organic micro-pollutants in surface and groundwater in the surrounding of a solid-waste treatment plant of Castellón, Spain, *Science of The Total Environment*, Volumes 548–549, 2016, Pages 211-220
- Retnam Ananth, Mohamad Pauzi Zakaria, Hafizan Juahir, Ahmad Zaharin Aris, Munirah Abdul Zali, Mohd Fadhlil Kasim, Chemometric techniques in distribution, characterisation and source apportionment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) in aquaculture sediments in Malaysia, *Marine Pollution Bulletin*, Volume 69, Issues 1–2, 2013, Pages 55-66,

- Qingling L, Xiaoqin X, Sen-Chun LF, Xiaoru W, 2006. Determination of trace PAHs in seawater and sediment pore-water by solid-phase microextraction (SPME) coupled with GC/MS. *Science in China Series B: Chemistry*. 2006;49(6):481-491
- Santos DI, Correia JN, Mateus MM, et al., 2019. Fourier Transform Infrared (FT – IR) Spectroscopy as a possible rapid tool to evaluate abiotic stress effects on pineapple by – products. *Appl Sci* 2019;9(4141):1-11
- Scott A. Stout, Stephen D. Emsbo-Mattingly, Gregory S. Douglas, Allen D. Uhler & Kevin J. McCarthy (2015) Beyond 16 Priority Pollutant PAHs: A Review of PACs used in Environmental Forensic Chemistry, *Polycyclic Aromatic Compounds*, 35:2-4, 285-315
- Siemers Anne-Kathrin, Jan Sebastian Mänz, Wolf-Ulrich Palm, Wolfgang K.L. Ruck, Development and application of a simultaneous SPE-method for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), alkylated PAHs, heterocyclic PAHs (NSO-HET) and phenols in aqueous samples from German Rivers and the North Sea, *Chemosphere*, Volume 122, 2015, Pages 105-114
- Shimadzu, 2020. Basics and Fundamentals – Gas Chromatography. C10G-E082
- Sibiya PN, 2012. Modification, development and application of extraction methods for PAHs in sediments and water [thesis]. South Africa: University of the Witwatersrand, Johannesburg; 2012
- Singh PK, Pande M, Singh LK, Tripathi RB, 2013. Steps to be considered during method development and validation for analysis of residual solvents by gas chromatography, *Int. Res J Pharm App Sci* 2013;3(5):74-80

Stiles R, Yang I, Lippincott RL, Murphy E, Buckley B. Measurement of drinking water contaminants by solid phase microextraction initially quantified in source water samples by the USGS. *Environ Sci Technol*. 2008

Sparkman DO, Penton Z, Kitson FG, 2011. *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide*. Academic Press. ISBN 978-0-08-092015-3

Sumar I., Ronald Cook, Paul W Ayers, Chérif F Matta, Aromaticity of rings-in-molecules (RIMs) from electron localization–delocalization matrices (LDMs), *The Royal Swedish Academy of Sciences*, 2015, *Physica Scripta*, Volume 91, Number 1

The International Pharmacopoeia, 2019. High – performance liquid chromatography. 2019;2016(01):1-9

Tiu Brylee David B., Reddithota J. Krupadam, Rigoberto C. Advincula, Pyrene-imprinted polythiophene sensors for detection of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 228, 2016, Pages 693-701

Tommasini M., Lucotti A., Alfè M., Ciajolo A., Zerbi G., Fingerprints of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in infrared absorption spectroscopy, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, Volume 152, 5 January 2016, Pages 134-148

Tehranirokh Masoomah, Marcel Van den Bronk, Peter Smith, Zach Dai, Kannan Ragunathan, Alina Muscalu, Simon Mills, Michael C Breadmore, Robert A Shellie, Automated liquid-liquid extraction of organic compounds from aqueous samples using a multifunction autosampler syringe, *Journal of Chromatography A*, Volume 1642, 2021, 462032

- Triantafyllaki S and Dassenakis M, 2005. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in seawater by high performance liquid chromatography with photodiode array and fluorescence detection. In: Proceedings of the 9th international conference on environmental science and technology; 1-3 September, 2005; Rhodes Island, Greece. p. 939-944
- Tuteja G, Rout C and Bishnoi NR, 2011. Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in leafy and underground vegetables: a case study around Panipat city, Haryana, India. *Journal of Environmental Science and Technology* 2011;4(6):611-620
- UNODC, 2009. Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens. United Nations Office on Drugs and Crime, United Nations Publications, New York, 2009. ISBN: 978-92-1-148243-0
- Vaneet Kumar, N C Kothiyal, Saruchi, Pankaj Vikas & Renu Sharma (2016), “Sources, distribution, and health effect of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) – current knowledge and future directions”, *Journal of the Chinese Advanced Materials Society*, 4(4), pp. 302 – 321.
- Viguri J., Verde J., Irabien A., Environmental assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediments of the Santander Bay, Northern Spain, *Chemosphere*, Volume 48, Issue 2, 2002, Pages 157-165,
- Yuan Meng, Xiaohui Liu, Shaoyong Lu, Tingting Zhang, Baichuan Jin, QiaoWang, Zhurui Tang, Ying Liu, Xiaochun Guo, Junli Zhou & Beidou Xi (2019), “A review on occurrence and risk of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in lakes of China”, *Science of the Total Environment*, 651, pp. 2497–2506

- Yusà, V., Quintas, G., Pardo, O., Pastor, A. & Guardia, M.d.l. (2006), "Determination of PAHs in airborne particles by accelerated solvent extraction and large-volume injection-gas chromatography-mass spectrometry", *Talanta*, vol. 69, no. 4, pp. 807-815.
- Weinstein, J.E., Crawford, K.D., Garner, T.R. & Flemming, A.J. (2010), "Screening-level ecological and human health risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in stormwater detention pond sediments of Coastal South Carolina, USA", *Journal of hazardous materials*, vol. 178, no. 1-3, pp: 906-916
- Wenzl, T., Simon, R., Anklam, E., & Kleiner, J. (2006). Analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in food and the environment needed for new food legislation in the European Union. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 25, 716–725
- Zeng, X., Sheng, G., Xiong, Y. & Fu, J. (2005), "Determination of polycyclic musks in sewage sludge from Guangdong, China using GC-EI-MS", *Chemosphere*, vol. 60, no. 6 SPEC. ISS., pp: 817-823
- Zhi H., Zhonghua Zhao, Lu Zhang, The fate of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and organochlorine pesticides (OCPs) in water from Poyang Lake, the largest freshwater lake in China, *Chemosphere*, Volume 119, 2015, Pages 1134-1140,
- Zhou CH, Zhao MR, Yang RJ, Zhu WB, Analysis of Three Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Solution Based on Two-Dimensional Fluorescence Correlation Spectroscopy, 2016, *Guang pu*, 36(2):449-453

Zhu H, Nidetz R, Zhou M, et al., 2015. Flow – through microfluid photoionization detectors for rapid and highly sensitive vapor detection. Lab Chip 2015;15:3021-3029

Zhu, J., Wang, Q., Li, M., Ren, L., Zheng, B. & Zou, X. (2017), “Binary mixed solvent-based solvent demulsification-dispersive liquid-liquid microextraction coupled with gas chromatography-tandem mass spectrometry in determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples”, Anal. Methods, 9, pp: 1855-1863

Zuazagoitia, D., Millán, E. & Garcia, R. (2007), "A screening method for polycyclic aromatic hydrocarbons determination in water by headspace SPME with GC-FID", Chromatographia, vol. 66, no. 9-10, pp: 773-777

Γεντεκάκης Ι, 2010. Φυσικές Διεργασίες, Ανάλυση και Σχεδιασμός. Κλειδάριθμος: Αθήνα (2010).

Καραγκιοζίδου, Ο. (2014), Μελέτη της κατανομής των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (ΠΑΥ) στα εισπνεύσιμα και αναπνεύσιμα αιωρούμενα σωματίδια αστικών περιοχών (Διπλωματική Εργασία), Θεσσαλονίκη: Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο

Ε.ΜΠΑΚΕΑΣ, Αεριοχρωματογραφία (Gas Chromatography), 2008

Σαμανίδου Β, 2015. Κεφάλαιο 6: Τεχνικές Προκατεργασίας Βιολογικών Δειγμάτων.
[Διαδίκτυο] Διαθέσιμο από:
https://repository.kallipos.gr/bitstream/11419/3672/1/02_chapter_6.pdf
Τελευταία Ενημέρωση: 2015, Ημερομηνία Ανάκτησης: 06/02/21